



FARMACOPEIA BRASILEIRA

VIII EDIÇÃO

100 ANOS

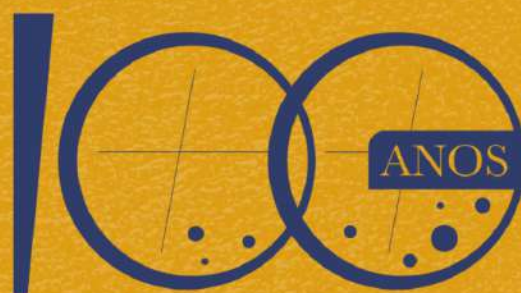
1926 - 2026

Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Brasília, 2026



FARMACOPEIA BRASILEIRA

VIII EDIÇÃO



1926 - 2026

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Farmacopeia
Brasileira,
8ª edição

Volume II – Monografias

Produtos Biológicos

Brasília
2026

Copyright © 2026. Agência Nacional de Vigilância Sanitária

É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.
É vedada a impressão, distribuição, reprodução desta obra para fins comerciais sem a prévia e expressa anuência da Anvisa.

Disponível em: < <https://bibliotecadigital.anvisa.gov.br/jspui/handle/anvisa/21040> >

Diretor-Presidente

Leandro Pinheiro Safatle

Diretores

Daniel Meirelles Fernandes Pereira

Daniela Marreco Cerqueira

Marcelo Mário Matos Moreira (diretor substituto)

Thiago Lopes Cardoso Campos

Gerente de Laboratórios de Saúde Pública

Graziela Costa Araújo

Coordenadora da Farmacopeia

Tháís Corrêa Rocha

Aprovado pela Resolução – RDC nº 1.026, de 15 de maio de 2026

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)**

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil)
Farmacopeia brasileira [livro eletrônico] :
volume II : monografias : produtos biológicos /
Agência Nacional de Vigilância Sanitária. --
8. ed. -- Brasília, DF : ANVISA, 2026.
PDF

ISBN 978-65-89701-49-1

1. Farmacopeia - Brasil 2. Produtos biológicos
I. Título.

26-365497.0 CDD-615.1181

Índices para catálogo sistemático:

1. Brasil : Farmacopeia 615.1181

Eliete Marques da Silva - Bibliotecária - CRB-8/9380



Elaboração e edição:

Agência Nacional de Vigilância Sanitária SIA Trecho 5,
Área Especial 57, Lote 200
71205-050 Brasília – DF

Projeto gráfico da capa

Igor Viana Coelho Henriques

“O projeto gráfico da Farmacopeia Brasileira foi desenvolvido para representar a solidez histórica e o rigor técnico do principal compêndio farmacêutico nacional.

A paleta em azul profundo associada aos elementos dourados reforça atributos como credibilidade, autoridade científica e sofisticação institucional. A composição utiliza uma linguagem visual inspirada em diagramas técnicos, cartografias científicas e sistemas de medição, traduzindo visualmente o conceito de padronização farmacêutica.

Os elementos gráficos orbitais e geométricos simbolizam:

- controle de qualidade;
- rastreabilidade científica;
- precisão analítica;
- construção contínua do conhecimento farmacêutico.

A hierarquia tipográfica foi reorganizada para destacar a VIII Edição da obra, reforçando seu caráter técnico e editorial contemporâneo, sem perder a relevância histórica da celebração do primeiro centenário da Farmacopeia Brasileira.” (Igor Henriques)

PRODUTOS BIOLÓGICOS

DALTEPARINA SÓDICA	PB001-00
ENOXAPARINA SÓDICA	PB002-01
HEPARINA CÁLCICA SOLUÇÃO INJETÁVEL	PB004-00
HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR	PB005-01
HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR SOLUÇÃO INJETÁVEL	PB006-00
HEPARINA SÓDICA BOVINA	PB007-01
HEPARINA SÓDICA SUÍNA	PB008-02
HEPARINA SÓDICA SOLUÇÃO INJETÁVEL	PB009-00
INSULINA	PB010-00
INSULINA HUMANA	PB011-00
INSULINA HUMANA INJETÁVEL	PB012-00
INSULINA HUMANA ISOFANA SUSPENSÃO	PB013-00
INSULINA HUMANA ISOFANA SUSPENSÃO E INSULINA HUMANA INJETÁVEL	PB014-00
INSULINA HUMANA ZINCO SUSPENSÃO	PB015-00
INSULINA HUMANA ZINCO SUSPENSÃO ESTENDIDA	PB016-00
INSULINA INJETÁVEL	PB017-00
INSULINA LISPRO	PB018-00
NADROPARINA CÁLCICA	PB019-00
SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE)	PB020-00
SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE) E ANTILAQUÉTICO	PB021-00
SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE) E ANTICROTÁLICO	PB022-00
SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE), ANTICROTÁLICO E ANTILAQUÉTICO	PB023-00
SORO ANTIBOTULÍNICO (TRIVALENTE)	PB024-00
SORO ANTICROTÁLICO	PB025-00
SORO ANTIDIFTÉRICO	PB026-00
SORO ANTIELAPÍDICO (BIVALENTE)	PB027-00
SORO ANTIESCORPIÔNICO	PB028-00
SORO ANTILONÔMICO	PB029-00
SORO ANTILOXOSCÉLICO (TRIVALENTE)	PB030-00
SORO ANTIRRÁBICO	PB031-00
SORO ANTITETÂNICO	PB032-00
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-A PARA USO HUMANO	PB033-00

SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-A,B PARA USO HUMANO	PB034-00
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-B PARA USO HUMANO	PB035-00
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-RH (ANTI-D, ANTI-C, ANTI-E, ANTI-c, ANTI-e E ANTI-C ^W) PARA USO HUMANO	PB036-00
SOROS HIPERIMUNES PARA USO HUMANO	PB037-02
TINZAPARINA SÓDICA	PB038-00
TOXOIDE TETÂNICO ADSORVIDO	PB039-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA E TÉTANO ADULTO	PB040-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA E TÉTANO INFANTIL	PB041-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO E PERTUSSIS	PB042-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS E HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)	PB043-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS, HEPATITE B (RECOMBINANTE) E HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)	PB044-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS, POLIOMIELITE 1, 2 E 3 (INATIVADA) E HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)	PB045-00
VACINA BCG	PB046-00
VACINA CAXUMBA (ATENUADA)	PB047-00
VACINA FEBRE AMARELA (ATENUADA)	PB048-01
VACINA HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)	PB049-01
VACINA HEPATITE B (RECOMBINANTE)	PB050-01
VACINA INFLUENZA (ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE, INATIVADA)	PB051-00
VACINA INFLUENZA (FRAGMENTADA, INATIVADA)	PB052-00
VACINA MENINGOCÓCICA ACWY (POLISSACARÍDICA)	PB053-01
VACINA MENINGOCÓCICA C (CONJUGADA)	PB054-00
VACINA POLIOMIELITE 1, 2 E 3 (ATENUADA)	PB055-00
VACINA POLIOMIELITE 1, 2 E 3 (INATIVADA)	PB056-00
VACINA RAIVA (INATIVADA)	PB057-02
VACINA ROTAVÍRUS HUMANO (ATENUADA)	PB058-00
VACINA RUBÉOLA (ATENUADA)	PB059-00
VACINA SARAMPO (ATENUADA)	PB060-00
VACINA SARAMPO, CAXUMBA, RUBÉOLA	PB061-00
VACINA SARAMPO, CAXUMBA, RUBÉOLA E VARICELA (ATENUADA)	PB062-00
VACINA SARAMPO, RUBÉOLA	PB063-00
VACINA VARICELA (ATENUADA)	PB064-00
VACINAS PARA USO HUMANO	PB065-02

DALTEPARINA SÓDICA

Dalteparinum natricum

A dalteparina sódica é um sal sódico de heparina de baixo peso molecular obtida por despolimerização com ácido nitroso da heparina de mucosa intestinal suína. A maioria dos componentes tem uma estrutura de ácido 2-O-sulfo- α -L-idopiranosurônico na extremidade não redutora e uma estrutura de 6-O-sulfo-2,5-anidro-D-manitol na extremidade redutora da sua cadeia.

A dalteparina sódica deve estar em conformidade com a monografia *Heparina de baixo peso molecular* com as modificações e exigências adicionais descritas a seguir.

A massa molecular média relativa varia de 5600 Da a 6400 Da, com um valor característico de cerca de 6000 Da. O grau de sulfatação é de 2,0 a 2,5 sulfatos por unidade dissacarídica. A potência da dalteparina sódica deve ser, no mínimo, 110 UI e, no máximo, 210 UI de atividade antifator Xa por miligrama, em relação à substância dessecada. A atividade do antifator IIa deve ser, no mínimo, 35 UI/mg e, no máximo, 100 UI/mg, em relação à substância dessecada. A razão da atividade antifator Xa pela atividade antifator IIa deve ser entre 1,9 e 3,2.

A dalteparina sódica deve ser produzida por meio de procedimentos validados de fabricação e purificação sob condições destinadas a minimizar a presença de grupos N-NO. O processo de fabricação deve ter sido validado para reduzir qualquer contaminação por grupos N-NO a limites permitidos utilizando um método validado de quantificação.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia *Heparina de baixo peso molecular*, utilizando a dalteparina sódica SR. Calcular a potência em relação à atividade antifator Xa por miligrama e à atividade antifator IIa. Calcular a razão da atividade antifator Xa para atividade antifator IIa.

B. Proceder conforme descrito no teste **B.** de *Identificação* da monografia *Heparina de baixo peso molecular*. O espectro obtido deve ser similar ao da dalteparina sódica SR.

C. Proceder conforme descrito no teste **C.** de *Identificação* da monografia *Heparina de baixo peso molecular*. Os seguintes requisitos se aplicam: a massa molecular média relativa varia entre 5600 Da e 6400 Da; a porcentagem em massa de cadeias mais baixas do que 3000 Da é, no mínimo, 13,0% (m/m); a porcentagem em massa de cadeias de massas moleculares mais elevadas do que 8000 Da varia entre 15,0% (m/m) e 25,0% (m/m).

CARACTERÍSTICAS

Aspecto da preparação. Dissolver 1 g da amostra em 10 mL de água purificada. A preparação é límpida (5.2.25).

ENSAIOS DE PUREZA

Nitrito. No máximo 5 ppm. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência* (5.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de dispositivo eletroquímico adequado com as seguintes características e ajustes: um eletrodo de trabalho adequado, um detector de potencial + 1,00 V versus um eletrodo de referência Ag/AgCl e um detector com sensibilidade de 0,1 uA e uma coluna de 125 mm de comprimento e 4,3 mm de diâmetro interno, empacotada com resina de troca iônica (aniônica) forte (10 μ m), mantida à 40 °C, fluxo da *Fase móvel* de 1 mL/minuto.

Fase móvel: solução constituída por 13,61 g de acetato de sódio SQR dissolvido em água purificada. Ajustar o pH para 4,3 com ácido fosfórico SR e diluir para 1000 mL utilizando água purificada.

Nota: lavar todos os balões volumétricos, pelo menos, três vezes com água purificada antes do preparo das soluções e antes de preparar as Soluções de referência (c), (d) e (e); lavar todas as pipetas com a Solução de referência (b).

Solução amostra: dissolver 80 mg da amostra em água purificada e completar o volume para 10 mL com o mesmo solvente. Deixar em repouso durante pelo menos 30 minutos.

Solução de referência (a): dissolver 60 mg de nitrito de sódio SQR em água purificada e diluir até 1000 mL com o mesmo solvente.

Solução de referência (b): utilizar uma pipeta previamente lavada com Solução de referência (a). Diluir 1 mL da Solução de referência (a) para 50 mL com água purificada.

Solução de referência (c): diluir 1 mL da Solução de referência (b) para 100 mL com água purificada (correspondente a 1 ppm de nitrito na amostra).

Solução de referência (d): diluir 3 mL da Solução de referência (b) para 100 mL com água purificada (correspondente a 3 ppm de nitrito na amostra).

Solução de referência (e): diluir 5 mL da Solução de referência (b) para 100 mL com água purificada (correspondente a 5 ppm de nitrito na amostra).

Procedimento: injetar 100 µL da Solução de referência (d). Quando os cromatogramas são registrados nas condições prescritas, o tempo de retenção para o nitrito é 3,3 a 4,0 minutos. O teste só é válido se: o número de pratos teóricos calculados para o pico de nitrito for de pelo menos 7000 por metro de coluna (a dalteparina sódica irá bloquear os sítios de ligação da fase estacionária, o que resultará em menores tempos de retenção e menor eficiência de separação para o analito; o desempenho inicial da coluna pode ser parcialmente restaurado utilizando 58 g/L de solução de cloreto de sódio SQR, a um fluxo de 1 mL/minuto durante uma hora; após a regeneração, a coluna é lavada com 200 mL a 400 mL de água purificada); o fator de simetria para o pico de nitrito for inferior a 3; o desvio padrão relativo da área de pico para o nitrito obtido a partir de seis injeções for inferior a 3%.

Injetar 100 µL cada uma das Soluções de referência (c) e (e). O teste só é válido se: o fator de correlação para uma relação linear entre a concentração e a resposta para as Soluções de referência (c), (d) e (e) for, no mínimo, 0,995; a relação sinal-ruído para Solução de referência (c) for, no mínimo, 5 (se o nível de ruído é demasiado elevado, a recalibração do eletrodo é recomendada); uma injeção em branco de água purificada não der origem a picos espúrios.

Injetar 100 µL da Solução amostra. Calcular o teor de nitrito a partir das áreas dos picos no cromatograma obtido com as Soluções de referência (c), (d) e (e).

Boro. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (5.2.13.2.2)*. Utilizar comprimento de onda específico para o boro. A linha de emissão a ser utilizada é 249,733 nm. Utilizar um aparelho apropriado, cujas configurações possam ser otimizadas conforme indicação do fabricante. No máximo 1 ppm. Preparar as soluções descritas a seguir.

Solução amostra: dissolver 0,25 g da substância a ser analisada em cerca de 2 mL de água, adicionar 100 µL de ácido nítrico SQR e diluir para 10 mL utilizando o mesmo solvente.

Solução de referência (a): preparar uma solução 1% (v/v) de ácido nítrico em água.

Solução de referência (b): preparar uma solução de 11,4 µg/mL de ácido bórico em *Solução de referência (a)*.

Solução de referência (c): dissolver 0,25 g de dalteparina sódica padrão sem boro detectável em cerca de 2 mL de água, adicionar 100 µL de ácido nítrico e diluir para 10 mL com o mesmo solvente.

Solução de referência (d): dissolver 0,25 g de dalteparina sódica padrão sem boro detectável em cerca de 2 mL de uma solução de 1% (v/v) de ácido nítrico em água, adicionar 10 µL de uma solução de 5,7 mg/mL de ácido bórico e diluir para 10 mL com o mesmo solvente. Esta solução contém 1 mg/mL de boro.

Calcular o teor de boro na substância a ser examinado, utilizando fator de correção obtido segundo a expressão:

$$f = \frac{(\text{Padrão}_1 - \text{Padrão}_0) \times 2}{(\text{Padrão}_{\text{cal}} - \text{Branco})}$$

em que,

Padrão₁ = *Solução de referência (d)*;

Padrão₀ = *Solução de referência (c)*;

Padrão_{cal} = *Solução de referência (b)*;

Branco = *Solução de referência (a)*.

Perda por dessecação (5.2.9.1). Pesar cerca de 1 g da amostra. Dessecar a amostra a 60 °C sobre pentóxido de fósforo a uma pressão máxima de 670 Pa durante três horas. No máximo 5%.

ENOXAPARINA SÓDICA

Enoxaparinum natricum

A enoxaparina sódica é o sal sódico de uma heparina de baixo peso molecular que é obtida através da despolimerização alcalina do benzil éster da heparina da mucosa intestinal suína. A enoxaparina consiste de um conjunto complexo de oligossacarídeos que ainda não foram completamente caracterizados. Com base no conhecimento atual, a maioria dos componentes tem uma estrutura uronato 4-enopiranosose na extremidade não redutora da sua cadeia. 15% a 25% dos componentes têm uma estrutura 1,6-anidro no terminal redutor da sua cadeia.

A enoxaparina sódica deve estar em conformidade com a monografia de *Heparina de baixo peso molecular* com as modificações e exigências adicionais descritas a seguir.

A massa molecular média relativa varia de 3800 Da a 5000 Da, com um valor característico de cerca de 4500 Da. O grau de sulfatação é cerca de dois sulfatos por unidade dissacarídica. A potência deve ser, no mínimo, 90 UI e, no máximo, 125 UI de atividade antifator Xa por miligrama, calculado em relação à substância dessecada. A atividade antifator IIa deve ser, no mínimo, 20,0 UI e, no máximo, 35,0 UI por miligrama, calculada em relação à substância dessecada. A razão da atividade antifator Xa pela atividade antifator IIa deve estar entre 3,3 e 5,3.

A enoxaparina é produzida por despolimerização alcalina do benzil éster da heparina de mucosa intestinal suína, em condições que resultam em um produto que esteja em conformidade com os requisitos estruturais descritos anteriormente.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia *Heparina de baixo peso molecular*, utilizando enoxaparina sódica padrão.

B. Proceder conforme descrito no teste **B.** de *Identificação* da monografia *Heparina de baixo peso molecular*. O espectro obtido deve ser similar ao da enoxaparina padrão.

C. Proceder conforme descrito no teste **C.** de *Identificação* da monografia *Heparina de baixo peso molecular*. Os seguintes requisitos se aplicam: a massa molecular média relativa tem variabilidade de massa entre 3800 Da e 5000 Da; a porcentagem de cadeias de peso molecular inferior a 2000 Da deve variar entre 12,0% e 20,0%; a porcentagem de cadeias com peso molecular entre 2000 Da e 8000 Da deve estar entre 68,0% e 82,0%.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto da preparação. Dissolver 1 g da amostra em 10 mL de água purificada. A preparação é límpida (5.2.25).

ENSAIOS DE PUREZA

pH (5.2.19). 6,2 a 7,7. Dissolver 1,0 g da amostra em 10 mL de água livre de dióxido de carbono.

Absorvância específica. 14,0 a 20,0 em relação à substância dessecada, determinado a 231 nm. Dissolver 50,0 mg da amostra em 100 mL de ácido clorídrico 0,01 M.

Conteúdo de álcool benzílico. No máximo 0,1% (m/m). Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector

ultravioleta a 256 nm; pré-coluna de 20 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (5 µm); coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (5 µm), mantida à temperatura de 40 °C, fluxo da *Fase móvel* de 1 mL/minuto.

Fase móvel: mistura de álcool metílico, acetonitrila e água (5:15:80).

Solução amostra: dissolver cerca de 0,500 g da amostra em 5,0 mL de hidróxido de sódio 1 M. Deixar em repouso à temperatura ambiente durante uma hora. Adicionar 1,0 mL de ácido acético glacial e diluir para 10,0 mL utilizando água.

Solução de referência: preparar solução de 0,25 g/L de álcool benzílico em água. Separar 0,50 mL dessa solução e diluir para 10,0 mL utilizando água.

Procedimento: injetar volumes iguais de *Solução de referência* e *Solução amostra* (20 µL), registrar os cromatogramas e medir a resposta dos picos. Calcular o teor percentual (m/m) de álcool benzílico segundo a expressão:

$$\frac{S_a}{S_r} \times \frac{C_r}{C_a} \times 100$$

em que,

S_a = área sob o pico de álcool benzílico da *Solução amostra*;

S_r = área sob o pico de álcool benzílico da *Solução de referência*;

C_r = concentração de álcool benzílico na *Solução de referência* (mg/mL);

C_a = concentração de álcool benzílico na *Solução amostra* (mg/mL).

Sódio. 11,3% a 13,5% em relação à substância dessecada.

HEPARINA CÁLCICA SOLUÇÃO INJETÁVEL

A heparina cálcica injetável é uma solução estéril de heparina cálcica dissolvida em água para injeção. Ela exibe uma potência de, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 110,0% da potência indicada no rótulo em termos de unidades internacionais de heparina por mL.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

pH (5.2.19). 5,0 a 8,0.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo 0,03 UE/UI de heparina.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Doseamento* da monografia de *Heparina sódica, solução injetável*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes para dose única ou multidose, em vidros tipo I.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR

Heparinum massae molecularis minoris

As heparinas de baixo peso molecular são preparações que contêm uma mistura de cadeias polissacarídicas de peso molecular variado. Por definição, as heparinas de baixo peso molecular devem apresentar peso molecular médio menor que 8000 Da e, para isso, é necessário que no mínimo 60% da massa total apresente peso molecular menor que 8000 Da. São obtidas através do fracionamento ou despolimerização da heparina suína. As heparinas de baixo peso molecular apresentam diferenças estruturais químicas nos terminais redutores ou não redutores da cadeia polissacarídica decorrentes do método de fracionamento utilizado. A atividade anticoagulante decorre da inibição de diversos fatores da cascata de coagulação, prolongando o tempo de coagulação do sangue. Isso ocorre principalmente através da potencialização da inativação do fator Xa. A potência anticoagulante é, no mínimo, 80 e, no máximo, 125 unidades de atividade antifator Xa por miligrama, em relação à substância dessecada. A razão da atividade antifator Xa pela atividade antifator IIa deve ser, no mínimo, 1,5. Os animais dos quais a heparina é derivada devem preencher os requisitos sanitários para a espécie em questão e o processo de produção deve garantir a remoção ou inativação de agentes infecciosos.

IDENTIFICAÇÃO

A. Cumpre as exigências descritas em *Doseamento*, segundo os métodos de *Atividade antifator Xa* e de *Atividade antifator IIa*.

B. Utilizar a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear unidimensional de próton. Preparar as soluções conforme descrito a seguir.

Solução padrão: preparar solução em concentração de, no mínimo, 20 mg/mL da heparina de baixo peso molecular utilizada como padrão interno em óxido de deutério 99,9% com 0,02% (p/v) de ácido trimetilsililpropiónico de sódio.

Solução amostra: preparar solução em concentração de, no mínimo, 20 mg/mL da amostra em óxido de deutério 99,9% com 0,02% (p/v) de ácido trimetilsililpropiónico de sódio.

Procedimento: na análise das amostras deve-se utilizar um espectrômetro de ressonância magnética nuclear de, no mínimo, 500 MHz operando o pulso (Transformada de Fourier) para aquisição de ^1H sob decaimento livre utilizando 16 scans em pulso de 90° . O ensaio deve ser realizado sob a temperatura constante de 25°C e um programa de supressão de água. A janela espectral deve ser no mínimo de 10 a -2 ppm. Para todas as amostras, o grupo metila do composto trimetilsililpropiónico deve ser referenciado em 0,00 ppm. Os espectros obtidos devem ser similares ao da heparina de baixo peso molecular específica de referência.

O espectro da amostra deve ser semelhante ao do padrão. Não deve ser observado o deslocamento químico entre 2,13 e 2,16 ppm, correspondente às regiões *N*-acetil.

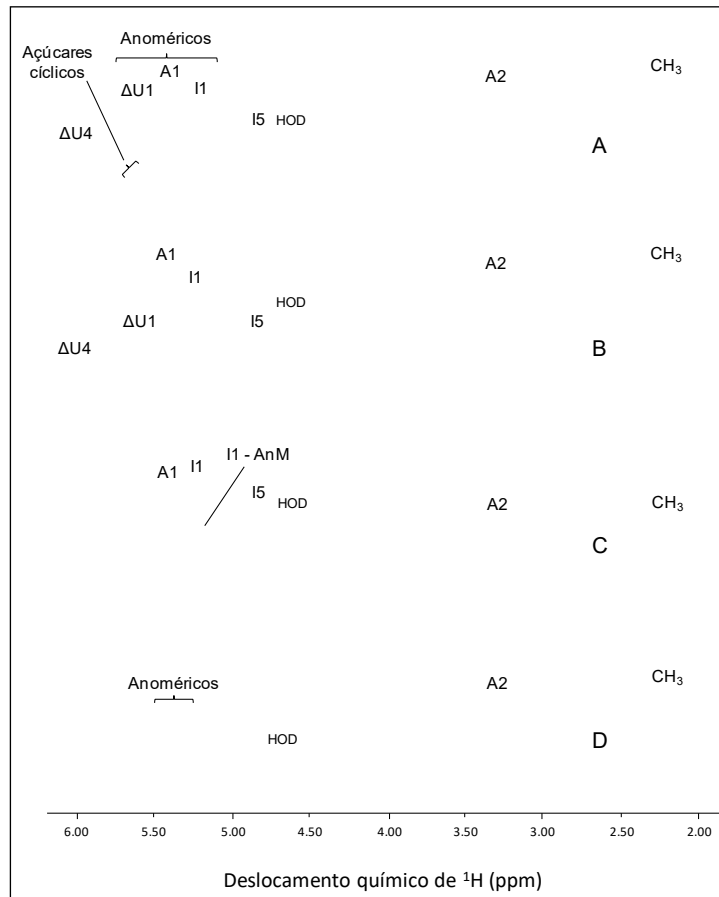


Figura 1 - Espectros de RMN 1D de ^1H de quatro tipos diferentes de heparina de baixo peso molecular.

Painel A – enoxaparina; Painel B – tinzaparina; Painel C – dalteparina; Painel D – nadroparina. Os sinais designados como A1 e A2 correspondem ao H1 e H2 das unidades de α -glucosamina 6- e N-disulfatadas; Os sinais I1 e I5 correspondem ao H1 e H5 do ácido α -idurônico 2- sulfatado; \square U1 e \square U4 correspondem ao H1 e H4 do ácido urônico 4,5 insaturado e 2- sulfatado. Os sinais referentes aos açúcares cíclicos (N-sulfatada, 1,6 anidro β -glucosamina ou β -manosamina) também estão indicados nos painéis. HOD – água deuterada.

C. Utilizar a técnica de cromatografia de filtração em gel para determinação da distribuição de peso molecular dos oligossacarídeos presentes na solução de heparina de baixo peso molecular. Utilizar cromatografia líquida de alta eficiência provida com detector de índice de refração e leitor ultravioleta a 232 nm; uma pré-coluna de 6,0 mm de diâmetro x 4,0 cm de altura, empacotada com matriz de sílica de 7 μm de diâmetro e duas colunas analíticas em série, de 7,5 mm de diâmetro x 30 cm de altura, empacotadas com matriz de sílica de 5 μm ou 10 μm que fraciona proteínas na faixa de aproximadamente 10 000 a 500 000 Da. Mínimo de 20 000 pratos teóricos por metro. Fluxo da fase móvel de 0,3 mL/minuto.

Preparar as soluções conforme descrito a seguir.

Fase móvel: solução de acetato de amônio 0,1 M, pH 6,0.

Solução padrão de calibração de peso molecular para heparinas de baixo peso molecular: solubilizar a amostra de heparina de baixo peso molecular padrão para calibração de peso molecular na concentração de 10 mg/mL na fase móvel no momento de realizar o ensaio.

Solução amostra: solubilizar a amostra-teste na concentração de 10 mg/mL na fase móvel.

Procedimento: injetar 20 µL da *Solução padrão* para determinação do perfil de eluição do padrão de calibração e, posteriormente, injetar 20 µL da amostra-teste para comparação com o perfil de eluição da *Solução padrão*.

Calibração: para a detecção, usar um detector de índice de refração conectado em série a um leitor de ultravioleta a 232 nm. É necessário medir o tempo decorrido entre a detecção dos dois leitores cuidadosamente, para que ambos os cromatogramas estejam alinhados corretamente. O tempo de retenção utilizado para os cálculos de calibração deve ser o tempo do detector de índice de refração (RI).

Deve-se calcular um fator de normalização para determinar a massa molecular relativa proveniente da razão RI/UV da seguinte maneira: calcule a área total sob a curva de UV₂₃₂ ($\sum UV_{232}$) e sob a curva de RI ($\sum RI$) através de integração numérica da área de interesse (excluindo picos de sal e solventes no final do cromatograma). Calcular a razão r utilizando a seguinte expressão:

$$r = \frac{\sum RI}{\sum UV_{232}}$$

Calcular o fator f usando a expressão a seguir:

$$f = \frac{M_{na}}{r}$$

Em que

M_{na} = massa molecular relativa média do padrão de heparina de baixo peso molecular para calibração CRS determinado pelo fabricante.

Certificar que as respostas de UV₂₃₂ e RI estão alinhadas e calcular a massa molecular relativa (M) de cada ponto usando a seguinte expressão:

$$M = f \frac{RI}{UV_{232}}$$

A tabela resultante de tempos de retenção e massa molecular relativa de cada ponto deve ser utilizada para derivar uma calibração para o sistema de cromatografia criando uma relação matemática para os valores tabelados. Recomenda-se traçar uma curva polinomial de 3º grau. Extrapolar os valores desta curva de calibração traçada para valores de massas moleculares mais elevados não é válido.

Injetar 20 µL da *Solução amostra* e registrar o cromatograma pelo período de tempo necessário para a completa eluição da amostra e dos picos de solventes.

A massa molecular relativa média é definida pela fórmula:

$$\frac{\sum (RI_i M_i)}{\sum RI_i}$$

em que,

RI_i = massa da substância que elui na fração i ;

M_i = massa molecular relativa correspondente à fração i .

Os valores de massa molecular relativa média devem ser, no máximo, 8000 e pelo menos 60% da massa total deve ter uma massa molecular relativa menor que 8000. Além disso, os parâmetros de massa molecular (massa molecular relativa média e porcentagem das cadeias compreendidas dentro de valores específicos) devem corresponder à preparação referência.

Comparar o tempo de retenção dos picos da amostra-teste com os picos oriundos da amostra padrão. O critério de validação ocorre caso os picos da amostra-teste correspondam aos picos da amostra padrão.

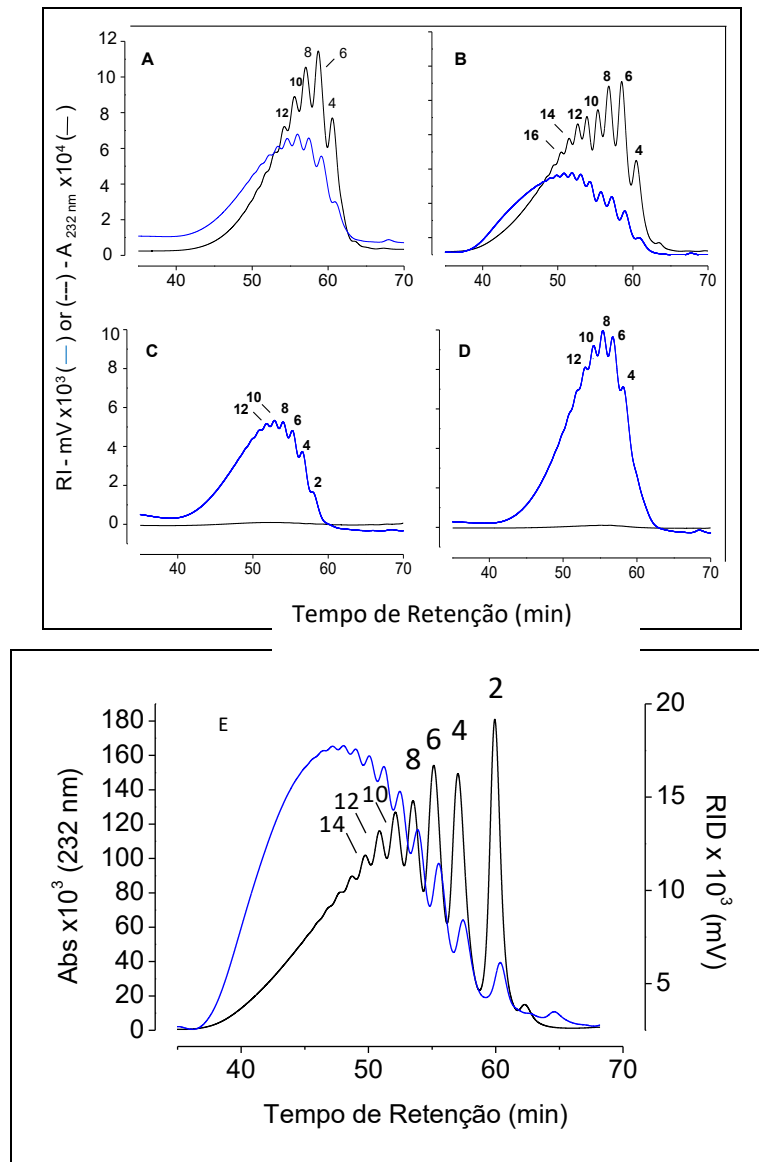


Figura 2 – Perfil de eluição das diferentes heparinas de baixo peso molecular pelo método de cromatografia de gel filtração. Perfis ilustrativos.

Análise da distribuição de pesos moleculares dos oligossacarídeos encontrados em diferentes preparações de LMWH. Preparações de enoxaparina (A), tinzaparina (B), dalteparina (C), nadroparina (D) e padrão de calibração de peso molecular (E). Os números representam as unidades dissacarídicas (2- dissacarídeo, 4- tetrassacarídeo, 6- hexassacarídeo, 8- octassacarídeo, 10- decassacarídeo, 12- dodecassacarídeo).

CARACTERÍSTICAS

Características físicas. Pó branco ou quase branco, higroscópico.

Solubilidade. Solúvel em água.

ENSAIOS DE PUREZA

pH (5.2.19). 5,5 a 8,0. Determinar em solução aquosa a 1% (p/v).

Proteínas. Adicionar cinco gotas de ácido tricloroacético a 20% (p/v) em 1 mL de solução aquosa da amostra a 1% (p/v). Não deve haver formação de precipitado ou turbidez.

Impurezas nucleotídicas. Dissolver 40 mg do material em 10 mL de água. A absorvância medida a 260 nm e 280 nm deve ser, no máximo, 0,20 e 0,15, respectivamente.

Nitrogênio (5.3.3.2). Utilizar o *Método I, macrodeterminação*. No mínimo 1,5% e, no máximo, 2,5% de nitrogênio, calculado em relação à substância dessecada.

Sódio. Entre 10,5% e 13,5% de sódio determinado conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção atômica (5.2.13.1)*.

Metais pesados (5.3.2.3). Utilizar o *Ensaio de identificação C*. Preparar a solução de referência utilizando 1,5 mL de solução padrão de chumbo (10 ppm de Pb). 0,5 g em conformidade com o teste de C. No máximo 30 ppm.

Perda por dessecação (5.2.9.1). No máximo 10%, determinado a partir de 1000 g em estufa a vácuo a 60 °C, por três horas, em pressão que não exceda 0,67 kPa.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo 0,01 UE por UI de atividade anti-Xa de heparina de baixo peso molecular.

DOSEAMENTO

Atividade antifator Xa

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4: dissolver quantidades de tris (hidroximetil) aminometano para obter concentração de 20 mM, cloreto de sódio para 150 mM e cloreto de cálcio para 10 mM em água destilada contendo macrogol 8000 a 0,1%. Se necessário, ajustar o pH para 7,4 com solução diluída de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

Solução de antitrombina humana: reconstituir o conteúdo da ampola de antitrombina humana conforme recomendado pelo fabricante. Homogeneizar. Diluir com *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, de modo a obter solução a 0,02 UI/mL (equivalente a 40 nM) de antitrombina humana.

Solução de fator Xa humano: reconstituir o conteúdo do frasco conforme recomendado pelo fabricante. Diluir a solução obtida em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, de modo a obter solução a 1,0 UI/mL (equivalente a 20 nM) de fator Xa humano.

Solução de substrato cromogênico para fator Xa: dissolver quantidade de *N- α -benziloxycarbonil-D-arginil-L-glicil-L-arginina-p-nitroanilina* diidrocloridratado em água destilada estéril obtendo

solução 2 mM. Antes do uso, diluir em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter a solução 0,4 mM. Proceder ao abrigo de luz direta.

Solução de parada: preparar uma solução a 50% (v/v) de ácido acético em água.

Solução padrão: utilizar solução padrão de heparina de baixo peso molecular. Pode ser utilizada outra preparação, cuja potência tenha sido determinada em relação ao padrão. Reconstituir o conteúdo da ampola de heparina de baixo peso molecular conforme recomendado pelo fabricante e misturar levemente até completa dissolução. A partir da solução reconstituída, preparar diluições em solução *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, de forma a obter pelo menos cinco soluções com concentração variando entre 0,2 e 0,005 UI/mL de atividade anti-Xa.

Solução amostra: dissolver quantidade da amostra em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter soluções com atividades aproximadamente iguais às da *Solução padrão*.

Procedimento: dois diferentes tipos de medições podem ser realizados, a *Medição cinética* e a *Medição "endpoint"*.

Medição cinética: os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo constante a relação entre os volumes. Executar o teste em microplacas e realizar a leitura espectrofotométrica a 405 nm em um leitor de microplacas a 37 °C. O ensaio deve ser realizado com cada *Solução padrão* e *Solução amostra* em duplicata. Em cada poço da microplaca, adicionar 40 µL de *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* ou da *Solução amostra*, 25 µL da *Solução de antitrombina humana* e 10 µL da *Solução de fator Xa humano*. Após dois minutos de incubação a 37°C, adicionar 25 µL da *Solução de substrato cromogênico para fator Xa*. Registrar a absorvância medida em 405 nm contra o branco durante cinco minutos. O branco é o teste realizado na ausência da adição de heparina de baixo peso molecular, utilizando 40 µL de *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*.

Medição "endpoint": proceder como descrito na *Medição cinética*. Após a adição do substrato cromogênico, esperar quatro minutos e parar a reação com a adição de 50 µL de *Solução de parada*.

Os modelos estatísticos para análise da relação entre inclinação das retas ou sobre paralelismo podem ser usados dependendo do melhor modelo que descreva a correlação entre a concentração e a resposta.

Ensaio sobre paralelismo: para cada série, calcular a regressão da absorvância ou mudança de absorvância por minuto contra as concentrações em logaritmo das *Soluções amostra* e das *Soluções padrões* e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de linhas paralelas. Expressar a potência da heparina de baixo peso molecular em UI/mg.

Relação entre inclinação das retas: para cada série, calcular a regressão da absorvância em logaritmo ou o logaritmo das alterações na absorção por minuto contra as concentrações das *Soluções amostra* e das *Soluções padrões* e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de relação entre inclinação das retas. Expressar a potência da heparina de baixo peso molecular em UI/mg, de base seca.

Crítérios de aceitação: a potência das heparinas de baixo peso molecular deve apresentar, no mínimo, 80 e, no máximo, 125 da atividade antifator Xa por mg.

Atividade antifator IIa

Proceder conforme descrito em *Atividade antifator Xa*, com exceção da *Solução de fator Xa humano* que deve ser trocada por *Solução de fator IIa humano* e da *Solução de substrato cromogênico N-α-*

benziloxycarbonil-D-arginil-L-glicil-L-arginina-p-nitroanilina diidrocloridrato que deve ser trocada pela *Solução de substrato cromogênico* H-D-fenilalanina-L-arginina-p-nitroanilina diidrocloridrato. O tampão a ser utilizado nesse ensaio é *tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, porém sem adição de cloreto de cálcio. Preparar a *Solução de fator IIa humano* e a *Solução de substrato cromogênico para fator IIa* como descrito a seguir.

Solução de fator IIa humano: reconstituir o conteúdo do frasco conforme recomendado pelo fabricante. Diluir a solução obtida em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* sem adição de cloreto de cálcio, de modo a obter solução a 2,0 UI/mL (equivalente a 20 nM) de fator IIa humano.

Solução de substrato cromogênico para fator IIa: dissolver quantidade de H-D-fenilalanina-L-arginina-p-nitroanilina diidrocloridrato em água destilada estéril obtendo solução 2 mM. Antes do uso, diluir em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter a solução 0,4 mM. Proceder ao abrigo de luz direta.

Proceder com as análises estatísticas e cálculos indicados em *Atividade antifator Xa*.

Crêterios de aceitação: a razão da atividade antifator Xa/antifator IIa deve ser, no mínimo, 1,5.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Observar a legislação vigente.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Anticoagulante.

HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR SOLUÇÃO INJETÁVEL

As preparações injetáveis de heparina de baixo peso molecular são soluções estéreis de heparina de baixo peso molecular diluída em água para injeção. A potência anticoagulante é, no mínimo, 90% e, no máximo, 110% da potência anti Xa declarada no rótulo em unidades por mililitro. A razão da atividade antifator Xa/antifator IIa deve ser observada de acordo com o tipo de solução de heparina de baixo peso molecular analisada. A enoxaparina apresenta uma faixa de variação da razão atividade antifator Xa/antifator IIa entre 3,3 e 5,3. Para a tinzaparina a razão varia entre 1,5 e 2,5. A dalteparina apresenta razão entre 1,9 e 3,2 e a nadroparina entre 2,5 e 4,0.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

pH (5.2.19). 5,5 a 7,5.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo 0,01 UE/UI de heparina de baixo peso molecular.

DOSEAMENTO

Atividade antifator Xa

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4: dissolver quantidades de tris (hidroximetil) aminometano para obter concentração de 20 mM, cloreto de sódio para 150 mM e cloreto de cálcio para 10 mM em água destilada contendo macrogol 8000 a 0,1%. Se necessário, ajustar o pH para 7,4 com solução diluída de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

Solução de antitrombina humana: reconstituir o conteúdo da ampola de antitrombina humana conforme recomendado pelo fabricante. Homogeneizar. Diluir com *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, de modo a obter solução a 0,02 UI/mL (equivalente a 40 nM) de antitrombina humana.

Solução de fator Xa humano: reconstituir o conteúdo do frasco conforme recomendado pelo fabricante. Diluir a solução obtida em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, de modo a obter solução a 1,0 UI/mL (equivalente a 20 nM) de fator Xa humano.

Solução de substrato cromogênico para fator Xa: dissolver quantidade de *N- α -benziloxicarbonil-D-arginil-L-glicil-L-arginina-p-nitroanilina* diidrocloreto em água destilada estéril obtendo solução 2 mM. Antes do uso, diluir em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter a solução 0,4 mM. Proceder ao abrigo de luz direta.

Solução de parada: preparar uma solução a 50% (v/v) de ácido acético em água.

Solução padrão: utilizar solução padrão de heparina de baixo peso molecular. Pode ser utilizada outra preparação, cuja potência tenha sido determinada em relação ao padrão. Reconstituir o conteúdo da ampola de heparina de baixo peso molecular conforme recomendado pelo fabricante e misturar levemente até completa dissolução. A partir da solução reconstituída, preparar diluições em solução

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4, de forma a obter pelo menos cinco soluções com concentração variando entre 0,2 e 0,005 UI/mL de atividade anti-Xa.

Solução amostra: dissolver quantidade da amostra em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter soluções com atividades aproximadamente iguais às da *Solução padrão*.

Procedimento: dois diferentes tipos de medições podem ser realizados, a *Medição cinética* e a *Medição “endpoint”*.

Medição cinética: os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo constante a relação entre os volumes. Executar o teste em microplacas e realizar a leitura espectrofotométrica a 405 nm em um leitor de microplacas a 37 °C. O ensaio deve ser realizado com cada *Solução padrão* e *Solução amostra* em duplicata. Em cada poço da microplaca, adicionar 40 µL de *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* ou da solução amostra, 25 µL da *Solução de antitrombina humana* e 10 µL da *Solução de fator Xa humano*. Após dois minutos de incubação a 37 °C, adicionar 25 µL da *Solução de substrato cromogênico para fator Xa*. Registrar a absorvância medida em 405 nm contra o branco durante cinco minutos. O branco é o teste realizado na ausência da adição de heparina de baixo peso molecular, utilizando 40 µL de *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*.

Medição “endpoint”: proceder como descrito na *Medição cinética*. Após a adição do substrato cromogênico, esperar quatro minutos e parar a reação com a adição de 50 µL de *Solução de parada*.

Os modelos estatísticos para análise da relação ente inclinação das retas ou sobre paralelismo podem ser usados dependendo do melhor modelo que descreva a correlação entre a concentração e a resposta.

Ensaio sobre paralelismo: para cada série, calcular a regressão da absorvância ou mudança de absorvância/minuto contra as concentrações em logaritmo das soluções de amostra e das soluções padrões e calcular a potência da heparina sódica de referência em UI/mL utilizando métodos estatísticos para ensaios de linhas paralelas. Expressar a potência da heparina de baixo peso molecular em UI/mL.

Relação entre inclinação das retas: para cada série, calcular a regressão da absorvância em logaritmo ou o logaritmo das alterações na absorção por minuto contra as concentrações das soluções de amostra e das soluções padrões e calcular a potência da heparina de baixo peso molecular padrão em UI/mL utilizando métodos estatísticos para ensaios de relação entre inclinação das retas. Expressar a potência de heparina de baixo peso molecular em UI/mL.

Crítérios de aceitação: a potência das preparações injetáveis de heparina de baixo peso molecular deve apresentar, no mínimo, 90% e, no máximo, 110% da atividade declarada no rótulo. A potência deve ser expressa em UI/mL.

Atividade antifator IIa

Proceder conforme descrito em *Atividade antifator Xa*, com exceção da *Solução de fator Xa humano* que deve ser trocada por *Solução de fator IIa humano* e da *Solução de substrato cromogênico N- α -benziloxycarbonil-D-arginil-L-glicil-L-arginina-p-nitroanilina diidrocloridrato* que deve ser trocada pela *Solução de substrato cromogênico H-D-fenilalanina-L-arginina-p-nitroanilina diidrocloridrato*. O tampão a ser utilizado nesse ensaio é *tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, porém sem adição de cloreto de cálcio. Preparar a *Solução de fator IIa* e a *Solução de substrato cromogênico* como descrito a seguir.

Solução de fator IIa humano: reconstituir o conteúdo do frasco conforme recomendado pelo fabricante. Diluir a solução obtida em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4 sem adição de cloreto de cálcio*, de modo a obter solução a 2,0 UI/mL (equivalente a 20 nM) de fator IIa humano.

Solução de substrato cromogênico para fator IIa: dissolver quantidade de H-D-fenilalanina-L-arginina-p-nitroanilina diidrocloreto em água destilada estéril obtendo solução 2 mM. Antes do uso, diluir em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter a solução 0,4 mM. Proceder ao abrigo de luz direta.

Proceder com as análises estatísticas e cálculos indicados em *Atividade antifator Xa*.

Crterios de aceitação: a potência das preparações injetáveis de heparina de baixo peso molecular deve apresentar, no mínimo, 90% e, no máximo, 110% da atividade declarada no rótulo. A potência deve ser expressa em UI/mL. A razão da atividade antifator Xa/antifator IIa deve ser observada de acordo com o tipo de solução de heparina de baixo peso molecular analisada. A enoxaparina apresenta uma faixa de variação da razão atividade antifator Xa/antifator IIa entre 3,3 e 5,3. Para a tinzaparina, a razão varia entre 1,5 e 2,5. A dalteparina varia entre 1,9 e 3,2 e a nadroparina entre 2,5 e 4,0.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Observar a legislação vigente.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

HEPARINA SÓDICA BOVINA

A heparina sódica bovina é extraída a partir da mucosa intestinal bovina e é formada por uma mistura de cadeias polissacarídicas heterogêneas e de peso molecular variado. É composta, em sua maioria, por unidades de α -D-glucosamina N,6 sulfato e ácido idurônico 2-O-sulfato. As unidades dissacarídicas da heparina bovina são distintas da heparina suína principalmente devido ao menor grau de 6-sulfatação da glucosamina. Em especial, observa-se maior proporção de unidades de α -glucosamina não sulfatada na posição 6. Possui atividade anticoagulante pela inibição de diversos fatores do sistema de coagulação, prolongando o tempo de coagulação do sangue. Isso ocorre principalmente por meio da potencialização da inativação do fator Xa e da trombina pela antitrombina. Contém, no mínimo, 100 unidades de atividade antifator IIa por mg de heparina, em relação à substância dessecada. A razão da atividade antifator Xa pela atividade antifator IIa deve estar entre 0,9 e 1,1. Como critério de aceitação para cada ensaio realizado para a atividade antifator IIa e Xa, a potência calculada com base no peso seco deve estar compreendida entre 90 e 110% da potência declarada. Os animais dos quais a heparina é extraída devem preencher os requisitos sanitários para a espécie em questão e o processo de produção deve garantir a remoção ou inativação de agentes infecciosos.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó branco ou quase branco, higroscópico.

Solubilidade. Solúvel em água.

IDENTIFICAÇÃO

A. Cumpre as exigências descritas em *Doseamento*, segundo os *métodos I* ou *II* de *Atividade antifator Xa* e de *Atividade antifator IIa*. A razão da atividade antifator IIa pela atividade antifator Xa deve ser no mínimo 0,9 e no máximo 1,1.

B. Utilizar a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear unidimensional de prótons. Preparar as soluções conforme descrito a seguir.

Solução amostra: preparar solução em concentração de, no mínimo, 20 mg/mL da amostra em óxido de deutério 99,9% com 0,02% (p/v) de ácido trimetilsililpropiónico de sódio.

Solução padrão: preparar solução em concentração de, no mínimo, 20 mg/mL do padrão de heparina sódica bovina em óxido de deutério 99,9% com 0,02% (p/v) de ácido trimetilsililpropiónico de sódio.

Solução para adequação do sistema: preparar solução a 1% (p/p) de sulfato de condroitina supersulfatado SQR em *Solução padrão*.

Procedimento: na análise das amostras deve-se utilizar um espectrômetro de ressonância magnética nuclear de, no mínimo, 500 MHz, tempo de aquisição mínimo de 2 s, tempo de repetição (tempo de espera mais tempo de aquisição) mínimo de 4 s. O ensaio deve ser realizado à temperatura constante de 35 °C com um programa de supressão de água. A janela espectral deve ser, no mínimo, de 10 a -2 ppm. Para todas as amostras, o grupo metila do composto trimetilsililpropiónico deve ser referenciado em 0,00 ppm. Os espectros obtidos devem ser similares ao da *Solução padrão*.

Adequação do sistema: os deslocamentos químicos correspondentes às regiões N-acetil da heparina e do sulfato de condroitina supersulfatado na *Solução para a adequação do sistema* devem ser observados em $2,05 \pm 0,03$ ppm e $2,16 \pm 0,03$ ppm, respectivamente. Os deslocamentos químicos

dos sinais correspondentes ao H1 e H2 das unidades de α -glucosamina 6- e *N*-disulfatadas (A1 e A2), ao H1 do ácido α -idurônico 2-sulfatado (I1), ao H1 das unidades de α -glucosamina *N*-sulfatada (C1) e ao grupamento metil da α -glucosamina *N*-acetilada (CH₃) da solução padrão estão presentes em 5,40; 3,28; 5,22; 5,31 e 2,05 ppm, respectivamente. Os valores de ppm observados para cada sinal não devem variar mais do que $\pm 0,03$ ppm.

Critério de aceitação das amostras: os deslocamentos químicos dos sinais A1, C1, I1, A2 e CH₃ devem ser observados a 5,40; 5,31; 5,22; 3,28 e 2,05 ppm, respectivamente. Os valores de ppm observados para cada sinal não devem variar mais do que $\pm 0,03$ ppm. As integrais dos sinais A1 e C1 devem ser obtidas conforme a orientação dos painéis da **Figura 1**, Painel C (em azul). Realizar o cálculo de acordo com a fórmula:

$$\frac{C1 \times 100}{A1} = 30 \text{ a } 58$$

Obrigatoriamente, o valor obtido deve estar entre 30 e 58. Nenhum sinal não identificado no espectro, na região de 0,10 – 2,00; 2,10 – 3,20 e 5,70 – 8,00 ppm, deve ultrapassar 4% da altura do sinal A1 (5,40 ppm). A Região em $2,16 \pm 0,03$ ppm, correspondente à região *N*-acetil do sulfato de condroitina supersulfatado não deve apresentar sinais com razão sinal-ruído maior ou igual a 2:1.

Nota: O EDTA poderá ser adicionado à solução amostra para a análise para melhorar a resolução do pico do ácido α -idurônico 2-sulfatado. Não mais que 12 $\mu\text{g/mL}$ podem ser adicionados e os espectros devem ser registrados e comparados com e sem adição de EDTA. Os deslocamentos químicos dos sinais do EDTA complexados ao Ca^{++} estão dentro da faixa que compreende 2,5 - 3,1 ppm e o sinal característico do EDTA livre possui deslocamento a $3,75 \pm 0,03$ ppm em pH 6,0.

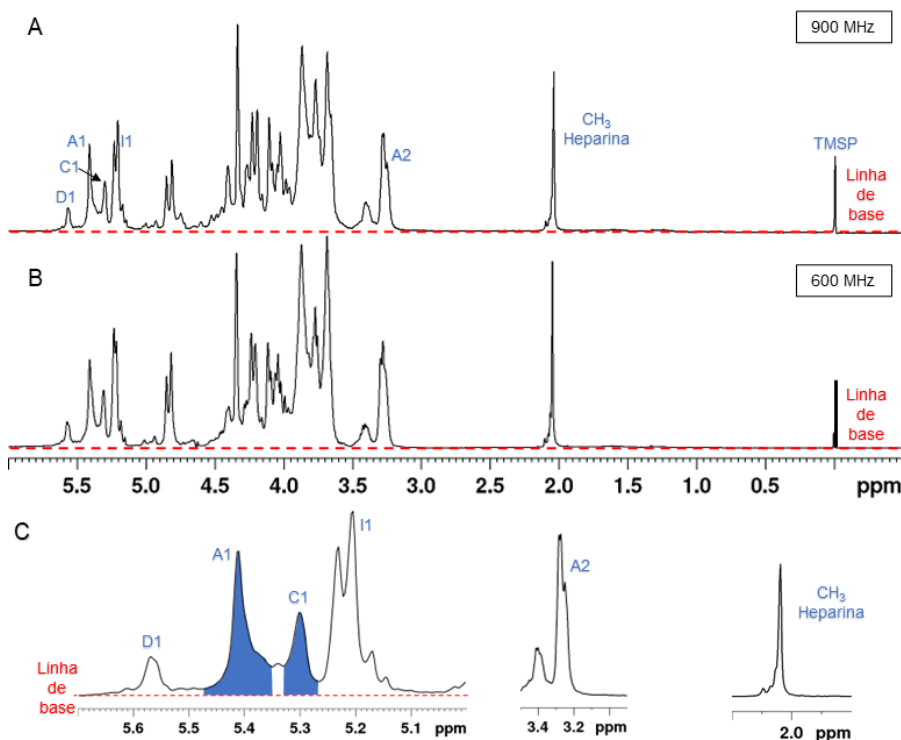


Figura 1 - Espectros de ressonância magnética nuclear unidimensional de próton a 900MHz (Painel Superior) e 500MHz (Painel intermediário). O painel inferior mostra a expansão da região indicada do Painel A.

Os sinais designados como A1 e A2 correspondem ao H1 e H2 das unidades de α -glucosamina 6- e N-disulfatadas em 5,40 e 3,28 ppm, respectivamente; o sinal I1 corresponde ao H1 do ácido α - idurônico 2-sulfatado em 5,21 ppm; C1 corresponde ao H1 das unidades de α -glucosamina N-sulfatada em 5,31 ppm; e metil da glucosamina N-acetilada em 2,05 ppm. Os valores de ppm observados para cada sinal não devem variar de $\pm 0,03$ ppm. No painel inferior são mostradas as expansões das regiões utilizadas para o cálculo do critério de aceitação (em azul). O intervalo entre 5,70 e 5,00 ppm indica a correta integração dos sinais A1 e C1.

C. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 202 nm ou 215 nm, desde que atenda à adequabilidade do sistema; pré-coluna de 50 mm de comprimento e 2,0 mm de diâmetro interno, empacotada com resina trocadora de ânions com partículas porosas de 13 μm e poro de 10 \AA (compatível com a coluna analítica); coluna analítica de 250 mm de comprimento e 2,0 mm de diâmetro interno, empacotada com resina trocadora de ânions, composta por um copolímero de etilvinilbenzeno/divinilbenzeno, com partículas porosas de 9 μm e poro de 2000 \AA , revestida por microesferas de látex de 70 nm funcionalizadas com íons de amônio quaternário alcano, mantida a 40 $^{\circ}\text{C}$; fluxo da *Fase móvel* de 0,5 mL/minuto. A coluna deve ser equilibrada por, pelo menos, 30 minutos com *Eluente A* da *Fase móvel* antes do início da análise.

Eluente A: preparar solução de TRIS a 20 mM. Ajustar o pH para 7,4 com ácido clorídrico diluído. Filtrar utilizando uma membrana de tamanho de poro de 0,22 μm e desaerar por pelo menos 15 minutos antes de usar.

Eluente B: preparar solução de TRIS a 20 mM e NaCl a 2,5 M. Ajustar o pH para 7,4 com ácido clorídrico diluído. Filtrar utilizando um filtro de membrana de tamanho de poro de 0,22 μm e desaerar por pelo menos 15 minutos antes de usar.

Gradiente da fase móvel: adotar sistema de gradiente descrito na tabela a seguir:

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Eluente A (%)</i>	<i>Eluente B (%)</i>	<i>Eluição</i>
0 – 4	83,4	16,6	equilíbrio
4 – 20	83,4→0	16,6→100	gradiente linear
20 – 22	0	100	isocrática
22 – 40	83,4	16,6	equilíbrio

Solução amostra (a): solução a 20 mg/mL da amostra em água destilada.

Solução amostra (b): adicionar 60 µL da *Solução amostra (a)* a 240 µL de água destilada no momento de realizar o ensaio.

Solução amostra (c): misturar 50 µL da *Solução amostra (a)* com 50 µL de nitrito de sódio 2 M e 50 µL de ácido sulfúrico 0,5 M. Misturar suavemente e, após 60 minutos à temperatura ambiente, adicionar 50 µL de hidróxido de sódio 1 M para interromper a reação. Adicionar 50 µL de água destilada para ajustar a concentração.

Solução de referência (a): solução a 20 mg/mL do padrão de heparina bovina em água destilada.

Solução de referência (b): adicionar 60 µL da *Solução de referência (a)* a 240 µL de água destilada no momento de realizar o ensaio.

Solução de referência (c): solução a 10 mg/mL de sulfato de dermatam SQR em água destilada.

Solução de referência (d): solução a 10 mg/mL de sulfato de condroitina supersulfatado SQR em água destilada.

Solução de referência (e): misturar 100 µL da *Solução de referência (a)* com 30 µL da *Solução de referência (c)* e 20 µL da *Solução de referência (d)*. Completar o volume para 500 µL com água destilada.

Solução de referência (f): misturar 50 µL da *Solução de referência (a)* com 50 µL de nitrito de sódio 2 M e 50 µL de ácido sulfúrico 0,5 M. Misturar suavemente e, após 60 minutos à temperatura ambiente, adicionar 50 µL de hidróxido de sódio 1 M para interromper a reação. Adicionar 50 µL de água destilada para ajustar a concentração.

Solução de referência (g): misturar 50 µL da *Solução de referência (a)* com 15 µL da *Solução de referência (c)* e 10 µL da *Solução de referência (d)*. A essa mistura, adicionar 50 µL de nitrito de sódio 2 M e 50 µL de ácido sulfúrico 0,5 M. Misturar suavemente e, após 60 minutos à temperatura ambiente, adicionar 50 µL de hidróxido de sódio 1 M para interromper a reação. Adicionar 25 µL de água destilada para ajustar a concentração.

Injetar, separadamente, 50 µL das *Soluções de referência (e)*, *(f)* e *(g)* e registrar os cromatogramas. Para a *Solução de referência (e)*, a relação entre a altura do pico do sulfato de dermatam e o vale (linha de base entre os picos de sulfato de dermatam e heparina bovina) é de, no mínimo, 1,3. Os tempos de retenção relativos são cerca de 0,9 para o sulfato de dermatam, 1,0 para a heparina sódica bovina e cerca de 1,1 para o sulfato de condroitina supersulfatado (Figura 2B). O cromatograma obtido com a *Solução de referência (f)* não apresenta nenhum pico no tempo de retenção da heparina. O cromatograma obtido com a *Solução de referência (g)* deve apresentar os picos referentes ao sulfato de dermatam e ao sulfato de condroitina supersulfatado visualmente distintos (Figura 2C, em preto)..

Procedimento: injetar, separadamente, 50 µL das *Soluções amostra (b)* e *(c)* e da *Solução de referência (b)* e registrar os cromatogramas. O pico referente à heparina sódica bovina obtido com o cromatograma da *Solução amostra (b)* deve ser semelhante em forma e tempo de retenção ao pico obtido com a *Solução de referência (b)* (Figura 2A). Não deve ser detectado nenhum pico no tempo de retenção do sulfato de condroitina supersulfatado no cromatograma da *Solução amostra (b)*. Nenhum pico deve ser detectado no tempo de retenção da heparina no cromatograma da *Solução amostra (c)* (Figura 2C, em azul).

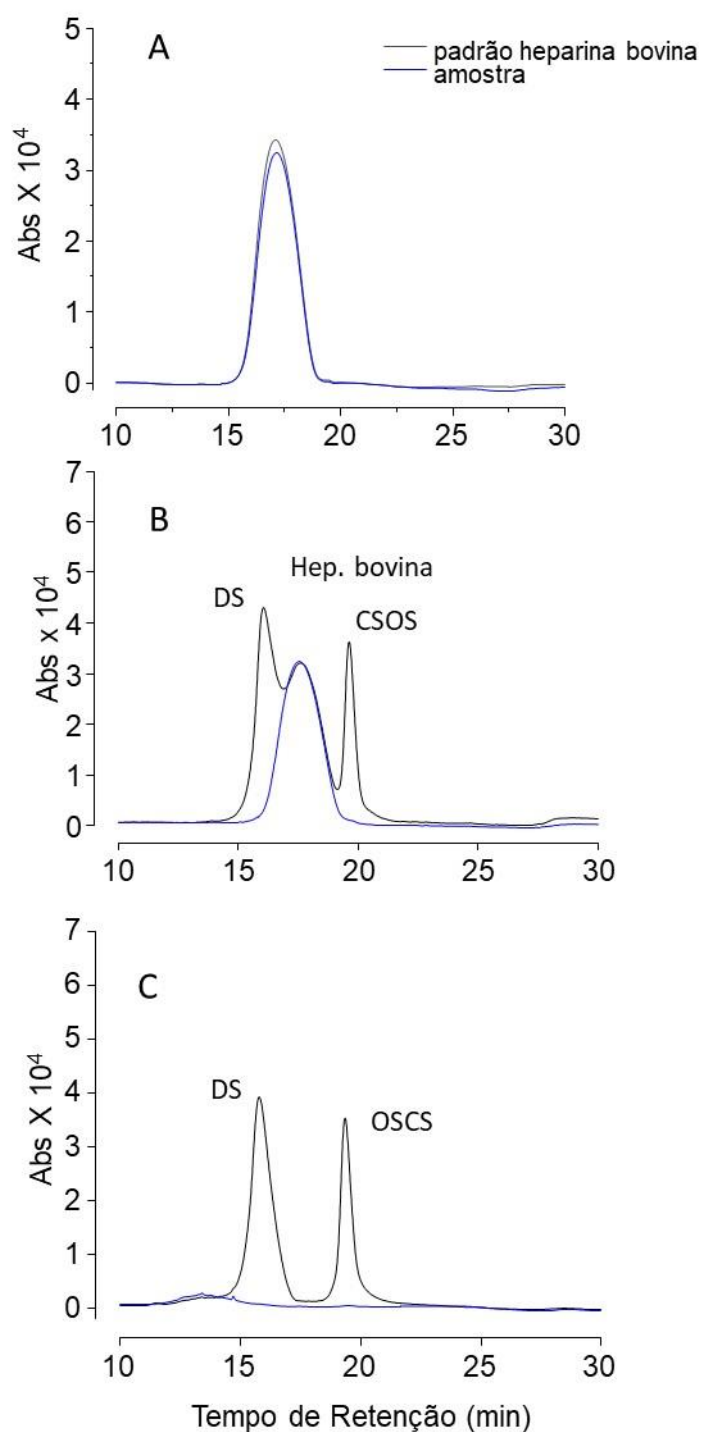


Figura 2 – Perfil de eluição da heparina sódica bovina na cromatografia líquida em coluna de troca iônica

O painel A mostra a eluição da heparina bovina (em preto) e da amostra-teste (em azul). O painel B mostra a eluição de uma mistura de padrões (em preto) e da amostra-teste (em azul). E o painel C mostra a eluição da mistura de padrões (em preto) e da amostra-teste (em azul) após tratamento com ácido nítrico.

D. Determinação de Peso Molecular.

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector de índice de refração; pré-coluna de 4,0 cm de comprimento e 6,0 mm de diâmetro interno, empacotada com matriz de sílica de 7 µm de diâmetro; coluna de 30 cm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno, empacotada com matriz de sílica de 3 µm com poro de 500 Å em série com uma coluna de 30 cm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno, empacotada com matriz de sílica de 3 µm com poro de 290 Å. Como alternativa, podem ser utilizadas duas colunas com as mesmas medidas (30 cm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno), a primeira com matriz de sílica de 8 µm e poro de 450 Å seguida de uma coluna com matriz de sílica de 5 µm e poro de 250 Å, mantida a 40 °C; fluxo da *Fase móvel* de 0,3 mL/minuto.

Fase móvel: acetato de amônio 0,1 M, pH 6,0.

Solução amostra: solução da amostra a 10 mg/mL em *Fase móvel*.

Solução padrão: solução a 10 mg/mL em *Fase móvel* do padrão de calibração de peso molecular para heparina não fracionada SQR.

Solução de adequação do sistema: solução a 10 mg/mL em *Fase móvel* do padrão de identificação de heparina sódica SQR na concentração de 10 mg/mL preparada no momento de realizar o ensaio.

Injetar 20 µL da *Solução de adequação do sistema*. Registrar o cromatograma pelo período de tempo necessário para a completa eluição da amostra e do pico atribuído ao sal. O peso molecular médio (M_w) calculado para a *Solução de adequação do sistema* deve ser arredondado para o valor da centena mais próximo. O valor encontrado deve ser de ± 500 Da do valor de M_w estabelecido para o padrão de identificação.

Deve haver resolução da linha de base entre os picos da heparina e do pico atribuído ao sal. O coeficiente de regressão linear da curva de calibração não deve ser menor que 0,99, utilizando uma equação polinomial de terceira ordem.

Procedimento: injetar, separadamente, 20 µL da *Solução padrão* e da *Solução amostra* e registrar os cromatogramas pelo período de tempo necessário para a completa eluição da amostra e do pico atribuído ao sal. Calcular a área total sob o pico de heparina no cromatograma da solução de calibração e a área cumulativa em cada ponto sob o pico como porcentagem do total. Não incluir o pico de sal. Usando a tabela fornecida para o calibrante de peso molecular para heparina, identificar os pontos no cromatograma para o qual a área percentual cumulativa está mais próxima das frações percentuais listadas na tabela e atribuir o peso molecular da tabela ao tempo de retenção (t_R) correspondente no cromatograma. Para a curva de calibração, os dados obtidos devem ser plotados em um gráfico como \log do peso molecular em função do tempo de retenção (t_R), obedecendo a uma equação polinomial de terceira ordem. Utilizar um software de cromatografia de filtração em gel (GPC) ou encontrar os valores de a , b , c e d da equação de forma que \log do peso molecular = $a + b(t_R) + c(t_R)^2 + d(t_R)^3$. Com os parâmetros obtidos, calcular o peso molecular aproximado para cada tempo de eluição da cromatografia.

Utilizando a função de calibração derivada como descrito acima, calcular o peso molecular médio (M_w) de acordo com a seguinte fórmula:

$$M_w = \frac{\sum(RI_i \cdot M)}{\sum RI_i}$$

em que a resposta do detector em cada ponto é definida como RI e o peso molecular em cada ponto é definido como M.

Determinar para o cromatograma da amostra-teste a porcentagem de heparina com peso molecular na faixa de 8000 a 16000 ($M_{8000 \rightarrow 16000}$), a porcentagem de heparina com peso molecular na faixa de 16000 a 24000 ($M_{16000 \rightarrow 24000}$) e a porcentagem de heparina com peso molecular superior a 24000 ($M_{>24000}$). Arredondar os valores percentuais médios para o 1% mais próximo. O M_w obtido deve estar entre 15000 e 19000. O valor de $M_{>24.000}$ deve estar abaixo de 20%, e a razão entre $M_{8000 \rightarrow 16000} / M_{16000 \rightarrow 24000}$ deve ser acima de 1,0.

ENSAIOS DE PUREZA

Limite de galactosamina no total de hexosamina. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector amperométrico pulsado; coluna guarda de 3 cm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno seguida de coluna analítica de 15 cm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno, empacotada com copolímero de etilvinilbenzeno/divinilbenzeno (6,5 μ m diâmetro) aglomerado com microesferas de 130 nm de látex funcionalizadas com amina quaternária, mantida a 30 °C; fluxo da *Fase móvel* de 0,5 mL/minuto. A coluna deve ser equilibrada por, pelo menos, 60 minutos com *Fase móvel* antes do início da análise e, por 10 minutos, antes de cada injeção. A coluna deve ser limpa passando-se hidróxido de potássio 100 mM por pelo menos 10 minutos após cada injeção.

Fase móvel: hidróxido de potássio 14 mM.

Solução amostra: transferir 12 mg da amostra para um tubo de ensaio com tampa de rosca de 7 mL, dissolver em 5 mL de ácido clorídrico 5 M e tampar.

Solução amostra hidrolisada: aquecer a *Solução amostra* por 6 horas a 100 °C. Resfriar à temperatura ambiente e diluir com água (1:100).

Solução padrão de glucosamina: cloridrato de glucosamina SQR a 1,6 mg/mL em ácido clorídrico 5 M.

Solução padrão de galactosamina: cloridrato de galactosamina SQR a 16 μ g/mL em ácido clorídrico 5 M.

Solução padrão: misturar volumes iguais da *Solução padrão de glucosamina* e da *Solução padrão de galactosamina*.

Solução padrão hidrolisada: transferir 5 mL da *Solução padrão* para um tubo de ensaio com tampa de rosca de 7 mL e aquecer por 6 horas a 100 °C. Resfriar à temperatura ambiente e diluir com água (1:100).

Injetar replicatas de 10 μ L da *Solução padrão hidrolisada*. A resolução entre os picos de galactosamina e glucosamina é, no mínimo, 2,0. A eficiência da coluna é, no mínimo, 2000 pratos teóricos, em relação ao pico da glucosamina. O fator de cauda para os picos de galactosamina e glucosamina é entre 0,8 e 2,0.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 μ L da *Solução padrão hidrolisada* e da *Solução amostra*

hidrolisada, registrar os cromatogramas por 10 minutos e medir as áreas sob os picos de galactosamina e de glucosamina. Calcular a razão de resposta de galactosamina para glucosamina ($GalN_R$) na *Solução padrão hidrolisada*, utilizando a fórmula:

$$\text{Resultado: } \left(\frac{GalN_B}{GalN_W} \right) \times \left(\frac{GlcN_W}{GlcN_B} \right)$$

em que,

$GalN_B$ = área sob o pico de galactosamina da *Solução padrão hidrolisada*.

$GalN_W$ = peso de galactosamina para a *Solução padrão*.

$GlcN_W$ = peso de glucosamina para a *Solução padrão*.

$GlcN_B$ = área sob o pico de glucosamina da *Solução padrão hidrolisada*.

Calcule a porcentagem de galactosamina na hexosamina total, utilizando a fórmula:

$$\text{Resultado} = \left\{ \frac{\left[\left(\frac{GalN_U}{GalN_R} \right) \right]}{\left[\left(\frac{GalN_U}{GalN_R} \right) + GlcN_U \right]} \right\} \times 100$$

em que,

$GalN_U$ = área sob o pico de galactosamina da *Solução amostra hidrolisada*.

$GalN_R$ = razão de resposta de galactosamina para glucosamina ($GalN_R$) na *Solução padrão hidrolisada*.

$GlcN_U$ = área sob o pico de glucosamina da *Solução amostra hidrolisada*.

A porcentagem da área sob o pico de galactosamina da hexosamina total da *Solução amostra hidrolisada* não é maior que 1,0%.

pH (5.2.19). 5,0 a 8,0. Determinar em solução aquosa a 1% (p/v).

Proteínas.

A. Adicionar cinco gotas de ácido tricloroacético a 20% (p/v) em 1 mL de solução aquosa da amostra 1% (p/v). Não deve formar precipitado ou turbidez.

B. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria no ultravioleta, visível, e infravermelho (5.2.14)*.

Solução A: misturar dois volumes de hidróxido de sódio 1% com dois volumes de carbonato de sódio 5% e diluir para cinco volumes com água.

Solução B: misturar dois volumes de sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 1,25% com dois volumes de tartarato de sódio ($C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$) 2,98% e diluir para cinco volumes com água.

Solução C: misturar um volume da *Solução B* com 50 volumes da *Solução A*.

Solução D: diluir adequadamente o reagente fosfomolibdotúngstico em água de modo que as soluções amostra e padrão tenham o valor de pH entre 10,00 e 10,50 após adição das *Soluções C e D*.

Solução amostra: preparar solução da amostra de concentração de 5 mg/mL em água.

Solução referência: preparar solução de albumina bovina R (cerca de 96% de proteína) de concentração de 100 mg/mL em água. Fazer diluições com água de maneira a obter no mínimo cinco soluções referência tendo concentrações de proteína distribuídas uniformemente na faixa de 5 µg/mL a 100 µg/mL.

Procedimento: adicionar 5 mL da *Solução C* para cada 1 mL das *Soluções referências*, *Solução amostra* e branco (água), respectivamente. Deixar em repouso por 10 minutos. Adicionar 0,5 mL da *Solução D*, misturar e deixar em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Medir as absorvâncias das soluções a 750 nm, utilizando a solução branco para ajuste do zero.

Curva de calibração: a relação da absorvância e a concentração de proteína não é linear. Contudo, se a faixa de concentração utilizada para traçar a curva padrão for suficientemente pequena, em último caso, se aproximará da linearidade. Construir uma curva padrão plotando as absorvâncias das soluções referência contra suas concentrações, utilizando regressão linear, traçar uma reta linear de melhor ajuste aos pontos plotados. Determinar a concentração de proteína na solução amostra, através de sua absorvância e da curva padrão. No máximo 0,5% em relação à substância dessecada.

Impurezas nucleotídicas. Dissolver 40 mg em 10 mL de água. A absorvância é medida a 260 nm eo resultado deve ser, no máximo, 0,15.

Nitrogênio (5.3.3.2). Utilizar o *Método I, macrodeterminação*. No mínimo, 1,5% e, no máximo, 2,5% de nitrogênio, calculado em relação à substância dessecada.

Sódio. Entre 10,5% a 13,5% de sódio determinado conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção atômica (5.2.13.1)*.

Perda por dessecação (5.2.9.1). Determinar em estufa a vácuo a 60 °C por três horas. No máximo, 8%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo, 0,03 UE/UI de heparina sódica bovina.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Método I

Atividade antifator IIa

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4: dissolver quantidades de tris (hidroximetil) aminometano para obter concentração de 20 mM, cloreto de sódio para 150 mM em água destilada contendo macrogol 8000 a 0,1%. Se necessário, ajustar o pH para 7,4 com solução diluída de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

Solução de antitrombina humana: reconstituir o conteúdo da ampola de antitrombina humana conforme recomendado pelo fabricante. Homogeneizar. Diluir com *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, de modo a obter solução 0,02 UI/mL (equivalente a 40 nM) de antitrombina humana.

Solução de fator IIa humano: reconstituir o conteúdo do frasco conforme recomendado pelo fabricante. Diluir a solução obtida em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, de modo a obter solução a 2,0 UI/mL (equivalente a 20 nM) de fator IIa humano.

Solução de substrato cromogênico para fator IIa humano: dissolver quantidade de dicloridrato de H-D-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-4-nitroanilida (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl) em água destilada estéril obtendo solução 2,0 mM. Antes do uso, diluir em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter a solução 0,4 mM. Proceder ao abrigo de luz direta.

Solução de parada: preparar uma solução a 50% (v/v) de ácido acético em água.

Solução padrão: para os ensaios de doseamento utilizar padrão de heparina sódica SQR. Reconstituir o conteúdo da ampola do padrão de heparina sódica SQR conforme recomendado pelo fabricante e misturar levemente até completa dissolução. A partir da solução reconstituída, preparar diluições em solução *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, de forma a obter pelo menos dez soluções com concentração variando entre 0,1 e 0,0001 UI/mL de atividade anti-IIa. As concentrações utilizadas devem apresentar, no mínimo, cincopontos dentro de uma faixa linear. A faixa de concentração utilizada pode ser adaptada para contemplar essa linearidade.

Solução amostra: dissolver quantidade da amostra em *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter soluções com atividades aproximadamente iguais às da *Solução padrão*.

Procedimento: dois diferentes tipos de medições podem ser realizados, a *medição cinética* e a *medição “endpoint”*.

Medição cinética: os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo as proporções entre as preparações de padrão, amostra em teste e reagentes. Executar o teste em microplacas e realizar a leitura espectrofotométrica a 405 nm em um leitor de microplacas a 37 °C. O ensaio deve ser realizado com cada *Solução padrão* e *Solução amostra* em duplicata. Em cada poço da microplaca adicionar: 40 µL de *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* ou 40 µL da *Solução padrão* ou 40 µL *Solução amostra*; 25 µL da *Solução de antitrombina* e 10 µL da *Solução de fator IIa humano*. Após dois minutos de incubação a 37 °C, adicionar 25 µL da *Solução de substrato cromogênico para fator IIa humano*. Registrar a absorvância medida em 405 nm contra o branco durante cinco minutos. O branco é o teste realizado na ausência da adição de heparina, utilizando 40 µL de *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*.

Medição “endpoint”: Após a adição da *Solução de substrato cromogênico para fator IIa humano* registrar a absorvância medida a 405nm e determinar o tempo para a adição da *Solução de parada* com base na linearidade da relação dose-resposta. Estabelecido o referido tempo, proceder a mesma reação seguida de adição de 50 µL de *Solução de parada*.

Os modelos estatísticos para análise da relação entre inclinação das retas ou sobre paralelismo podem ser usados dependendo do melhor modelo que descreva a correlação entre a concentração e a resposta.

Ensaio sobre paralelismo: para cada série, calcular a regressão da absorvância ou mudança de absorvância/minuto contra as concentrações em logaritmo das soluções de amostra e das soluções padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de linhas paralelas. Expressar a potência da heparina sódica bovina em UI/mg, de base seca.

Relação entre inclinação das retas: para cada série, calcular a regressão da absorvância em logaritmo ou o logaritmo das alterações na absorção por minuto contra as concentrações das soluções de amostra

e das soluções padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de relação entre inclinação das retas. Expressar a potência da heparina sódica bovina em UI/mg, de base seca.

Critérios de aceitação: a potência das heparinas sódicas bovinas deve apresentar, no mínimo, 100 UI da atividade antifator IIa por mg.

Atividade antifator Xa

Proceder conforme descrito em *Atividade antifator IIa*, com exceção da *Solução de fator IIa humano* que deve ser trocada por *Solução de fator Xa humano* e da *Solução de substrato cromogênico* dicloridrato de H-D-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-4-nitroanilida (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl) que deve ser trocada pela *Solução de substrato cromogênico* dicloridrato de N- α -benziloxycarbonil-D-arginil-L-glicil-L-arginina-4-nitroanilida (N- α -Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA.2HCl). O tampão a ser utilizado nesse ensaio é *tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, porém com adição de cloreto de cálcio 10 mM. Preparar a *Solução de fator Xa humano* e a *Solução de substrato cromogênico para fator Xa humano* como descrito a seguir.

Solução de fator Xa humano: reconstituir o conteúdo do frasco conforme recomendado pelo fabricante. Diluir a solução obtida em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* com adição de cloreto de cálcio, de modo a obter solução a 1,0 UI/mL (equivalente a 20 nM).

Solução de substrato cromogênico para fator Xa humano: dissolver quantidade de dicloridrato de N- α -benziloxycarbonil-D-arginil-L-glicil-L-arginina-4-nitroanilida (N- α -Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA.2HCl) em água destilada estéril obtendo solução 2,0 mM. Antes do uso, diluir em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter a solução 0,4 mM. Proceder ao abrigo de luz direta.

Proceder com as análises estatísticas e cálculos indicados em *Atividade antifator IIa*.

Critérios de aceitação: a potência da heparina bovina sódica deve apresentar, no mínimo, 100 UI da atividade antifator IIa por mg. A razão da atividade antifator Xa/antifator IIa deve ser, no mínimo, 0,9, e, no máximo, 1,1.

B. Método II

Atividade antifator IIa

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4: dissolver 6,10 g de tris (hidroximetil) aminometano, 10,2 g de cloreto de sódio, 2,8 g edetato de sódio e 10,0 g de macrogol 6000 em 800 mL de água destilada. Ajustar o pH para 8,4 com solução diluída de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio e completar com água para 1000 mL.

Solução de antitrombina: reconstituir o conteúdo da ampola de antitrombina conforme recomendado pelo fabricante. Homogeneizar e diluir com *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de modo a obter uma solução de antitrombina a 5,0 UI/mL. Diluir com o mesmo tampão para se obter uma concentração de 0,125 UI/mL.

Solução de trombina humana: reconstituir o conteúdo da ampola de trombina humana (fator IIa) em água destilada para uma concentração de 20 UI/mL e diluir em *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de modo a obter uma solução de trombina a 5,0 UI/mL.

Solução de substrato cromogênico: diluir um substrato cromogênico de trombina para teste amidolítico em água para que se obtenha 1,25 mM.

Solução de parada: preparar uma solução a 20% (v/v) de ácido acético em água.

Solução padrão: reconstituir o conteúdo da ampola do padrão de heparina sódica SQR e misturar levemente até completa dissolução. A partir da solução reconstituída, preparar diluições em solução *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de forma a obter pelo menos quatro soluções com concentração variando entre 0,005 e 0,03 UI/mL.

Solução amostra: dissolver quantidade da amostra em *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4* de modo a obter soluções com atividades aproximadamente iguais às da solução padrão.

Procedimento: os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo as proporções entre as preparações de padrão, amostra em teste e reagentes. O ensaio deve ser realizado com cada solução padrão e solução amostra em duplicata. Os tubos devem ser identificados de acordo com o número de replicatas a serem testadas. Distribuir os brancos nas colunas de forma que representem o comportamento dos reagentes durante o ensaio. O branco é o teste realizado na ausência da adição de heparina, utilizando 50-100 µL de *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*.

Todas as soluções de reagentes, padrão e amostra em teste devem ser pré-aquecidas a 37 °C por 15 minutos antes de serem adicionadas nos tubos. Transferir para cada um dos tubos plásticos, separadamente, um volume fixo (por exemplo, 50-100 µL) de cada uma das diferentes diluições de *Solução padrão*, ou *Solução amostra* ou *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*. Adicionar em cada um dos tubos um volume dobrado da *Solução de antitrombina* (100-200 µl). Homogeneizar todos os tubos, suavemente, sem produzir bolhas, e incubar a 37 °C por, no mínimo, um minuto. Adicionar em cada tubo 25-50 µL da *Solução de trombina humana* e incubar a 37 °C por, no mínimo, um minuto. Adicionar 50-100 µL da *Solução de substrato cromogênico*, homogeneizar.

Dois diferentes tipos de medições podem ser realizados, a *medição cinética* e a *medição “endpoint”*.

Medição “endpoint”: parar a reação após um minuto com 50-100 µL de solução de parada. Registrar a absorvância de cada solução a 405 nm. O desvio padrão relativo entre as leituras obtidas com o branco deve ser menor que 10%.

Medição cinética: registrar a mudança na absorvância para cada solução durante um minuto, medida em 405 nm. Expressar como mudança na absorção por minuto ($\Delta OD/\text{minuto}$) das soluções e dos brancos, os quais devem apresentar valores superiores devido à ausência de heparina. O desvio padrão relativo entre as leituras obtidas com o branco deve ser menor que 10%.

Cálculos: os modelos estatísticos para análise da relação ente inclinação das retas ou sobre paralelismo podem ser usados dependendo do modelo que descreva melhor a correlação entre a concentração e a resposta.

Ensaio sobre paralelismo: para cada série, determinar a regressão da absorvância ou mudança de absorvância/minuto contra o logaritmo das concentrações das soluções de amostra e das soluções de padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de linhas paralelas. Expressar a potência da heparina sódica bovina em UI/mg de base seca.

Relação entre inclinação das retas: para cada série, determinar a regressão do logaritmo da absorvância ou o logaritmo das alterações na absorção por minuto contra as concentrações das

soluções de amostra e das soluções de padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de relação entre inclinação das retas. Expressar a potência da heparina bovina sódica em UI/mg, de base seca.

Crítérios de aceitação: a potência da heparina sódica bovina deve apresentar, no mínimo, 100 UI da atividade antifator IIa por mg.

Atividade antifator Xa

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4: dissolver quantidades de tris (hidroximetil) aminometano, ácido edético ou edetato de sódio, e cloreto de sódio em água destilada contendo macrogol 6000 a 0,1% para se obter concentrações de 0,05 M; 0,0075M e 0,175 M, respectivamente. Se necessário, ajustar o pH para 8,4 com solução diluída de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

Solução de antitrombina: reconstituir o conteúdo da ampola de antitrombina conforme recomendado pelo fabricante. Homogeneizar e diluir com *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de modo a obter uma solução de antitrombina a 1,0 UI/mL.

Solução de fator Xabovino: reconstituir o conteúdo do frasco conforme recomendado pelo fabricante. Diluir a solução obtida em *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de modo a obter uma solução que resulte em 0,65 a 1,25 de absorvância a 405 nm quando testada como descrito abaixo, substituindo os 30 µL de solução de amostra por 30 µL de solução tampão pH 8,4.

Solução de substrato cromogênico para fator Xa: diluir em água um substrato cromogênico para teste amidolítico, específico para o fator Xa, para que se obtenha uma concentração de 1 mM.

Solução de parada: preparar uma solução a 20% (v/v) de ácido acético em água.

Solução padrão: reconstituir o conteúdo da ampola do padrão de heparina sódica SQR e misturar levemente até completa dissolução. A partir da solução reconstituída, preparar diluições em solução *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de forma a obter pelo menos cinco soluções com concentração variando entre 0,03 e 0,375 UI/mL de atividade antifator Xa.

Solução amostra: dissolver quantidade da amostra em *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4* de modo a obter soluções com atividades aproximadamente iguais às da solução padrão.

Procedimento: os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo as proporções entre as preparações de padrão, amostra em teste e reagentes. Transferir 120 µL de *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4* para tubos plásticos mantidos a 37 °C. Em cada tubo, separadamente, adicionar 30 µL das diferentes diluições da *Solução padrão* ou da *Solução amostra*. Adicionar em cada tubo 150 µL da *Solução de antitrombina* pré-aquecida a 37 °C por 15 minutos, homogeneizar e incubar por dois minutos. Adicionar 300 µL da *Solução de fator Xa humano* pré-aquecida a 37 °C por 15 minutos, homogeneizar e incubar por dois minutos. Adicionar 300 µL da *Solução de substrato cromogênico para fator Xa humano* pré-aquecida a 37 °C por 15 minutos, homogeneizar e, após incubar por dois minutos, adicionar em cada tubo 150 µL da *Solução de parada* e misturar. Para zerar o espectrofotômetro, preparar um branco, adicionando os reagentes em ordem inversa, a partir da *Solução de parada* até a adição final de 150 µL do *tampão tris (hidroximetil) nometano pH 8,4*, omitindo a *Solução padrão* e *Solução amostra*. Registrar a absorvância medida em 405 nm contra o branco.

Cálculos: determinar os valores do logaritmo da absorvância contra as concentrações das soluções de amostra e das soluções padrões. Calcular a atividade da amostra usando os métodos estatísticos para

o ensaio de relação entre inclinação das retas. Calcular a atividade antifator Xa segundo a equação:

$$P \times \left(\frac{SA}{SP} \right)$$

em que,

P = potência da heparina sódica padrão de referência;

SA = inclinação da reta para a *Solução amostra*;

SP = inclinação da reta para a *Solução padrão*.

Expressar a atividade antifator Xa da heparina sódica bovina em UI/mg, de base seca.

Crítérios de aceitação: calcular a relação da atividade do antifator Xa contra a potência do antifator IIa (antifator Xa / antifator IIa), que deve estar compreendida entre 0,9 e 1,1.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Anticoagulante.

HEPARINA SÓDICA SUÍNA

A heparina sódica suína é extraída de mucosa intestinal suína e é formada por uma mistura de cadeias polissacarídicas de peso molecular variado. É composta, preponderantemente, por unidades alternadas de α -D-glucosamina N- e 6- disulfatadas e ácido α -idurônico 2-sulfatado. Possui atividade anticoagulante devido à inibição de diversos fatores do sistema de coagulação, prolongando o tempo de coagulação do sangue. Isso ocorre principalmente por meio da potencialização da inativação do fator Xa e da trombina pela antitrombina. Contém, no mínimo, 180 unidades de atividade antifator IIa por mg de heparina, em relação à substância dessecada. A razão da atividade antifator Xa pela atividade antifator IIa deve estar entre 0,9 e 1,1. Como critério de aceitação para cada ensaio realizado para a atividade antifator IIa e Xa, a potência calculada com base no peso seco deve estar compreendida entre 90% e 110% da potência declarada. Os animais dos quais a heparina é extraída devem preencher os requisitos sanitários para a espécie em questão e o processo de produção deve garantir a remoção ou inativação de agentes infecciosos.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó branco ou quase branco, higroscópico.

Solubilidade. Solúvel em água

IDENTIFICAÇÃO

A. Cumpra as exigências descritas em *Doseamento*, segundo os métodos I ou II de *Atividade antifator Xa* e de *Atividade antifator IIa*. A razão da atividade antifator Xa pela atividade antifator IIa deve ser, no mínimo, 0,9 e, no máximo, 1,1

B. Utilizar a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear unidimensional de próton. Preparar as soluções conforme descrito a seguir.

Solução amostra: preparar solução em concentração de, no mínimo, 20 mg/mL da amostra em óxido de deutério 99,9% com 0,02% (p/v) de ácido trimetilsililpropiónico de sódio.

Solução padrão: preparar solução em concentração de, no mínimo, 20 mg/mL de padrão de identificação heparina sódica SQR em óxido de deutério 99,9% com 0,02% (p/v) de ácido trimetilsililpropiónico de sódio.

Solução para adequação do sistema: preparar solução a 1% (p/p) de sulfato de condroitina supersulfatado SQR em *Solução padrão*.

Procedimento: na análise das amostras deve-se utilizar um espectrômetro de ressonância magnética nuclear de, no mínimo, 500 MHz, tempo de aquisição mínimo de 2s, tempo de repetição (tempo de espera mais tempo de aquisição) mínimo de 4s. O ensaio deve ser realizado à temperatura constante de 35 °C com um programa de supressão de água. A janela espectral deve ser, no mínimo, de 10 a -2 ppm. Para todas as amostras, o grupo metila do composto trimetilsililpropiónico deve ser referenciado em 0,00 ppm. Os espectros obtidos devem ser similares ao da *Solução padrão*

Adequação do sistema: os deslocamentos químicos correspondentes às regiões N-acetil da heparina e do sulfato de condroitina supersulfatado na *Solução para a adequação do sistema* devem ser observados em $2,05 \pm 0,03$ ppm e entre $2,16 \pm 0,03$ ppm, respectivamente. Os deslocamentos químicos dos sinais correspondentes ao H1 e H2 das unidades de α -glucosamina 6- e N-disulfatadas

(A1 e A2), ao H1 do ácido α -idurônico 2-sulfatado (I1), ao H1 das unidades de α -glucosamina *N*-sulfatada (C1) e ao grupamento metil da α -glucosamina *N*-acetilada (CH3) da solução padrão estão presentes em 5,40; 3,28; 5,22; 5,31 e 2,05 ppm, respectivamente. Os valores de ppm observados para cada sinal não devem variar mais do que $\pm 0,03$ ppm.

Critério de aceitação das amostras: os deslocamentos químicos dos sinais A1, C1, I1, A2 e CH₃ devem ser observados a 5,40; 5,31; 5,22; 3,28 e 2,05 ppm, respectivamente. Os valores de ppm observados para cada sinal não devem variar além de $\pm 0,03$ ppm. As integrais dos sinais A1 e C1 devem ser obtidas conforme a orientação dos painéis da **Figura 1**, Painel C (em azul). Realizar o cálculo de acordo com a fórmula:

$$\frac{C1 \times 100}{A1} = \leq 20$$

Obrigatoriamente, o valor obtido deve ser menor que 20%. Nenhum sinal não identificado no espectro, na região de 0,10 - 2,00; 2,10 - 3,20 e 5,70 - 8,00 ppm, deve ultrapassar 4% da altura do sinal A1 (5,40 ppm). A Região em $2,16 \pm 0,03$ ppm, correspondente à região *N*-acetil do sulfato de condrotina supersulfatado não deve apresentar sinais com razão sinal-ruído maior ou igual a 2:1.

Nota: O EDTA poderá ser adicionado à solução amostra para a análise para melhorar a resolução do pico do ácido α -idurônico 2-sulfatado. Não mais que 12 $\mu\text{g/mL}$ podem ser adicionados e os espectros devem ser registrados e comparados com e sem adição de EDTA. Os deslocamentos químicos dos sinais do EDTA complexados ao Ca^{++} estão dentro da faixa que compreende 2,5 - 3,1 ppm e o sinal característico do EDTA livre possui deslocamento a $3,75 \pm 0,03$ ppm em pH 6,0.

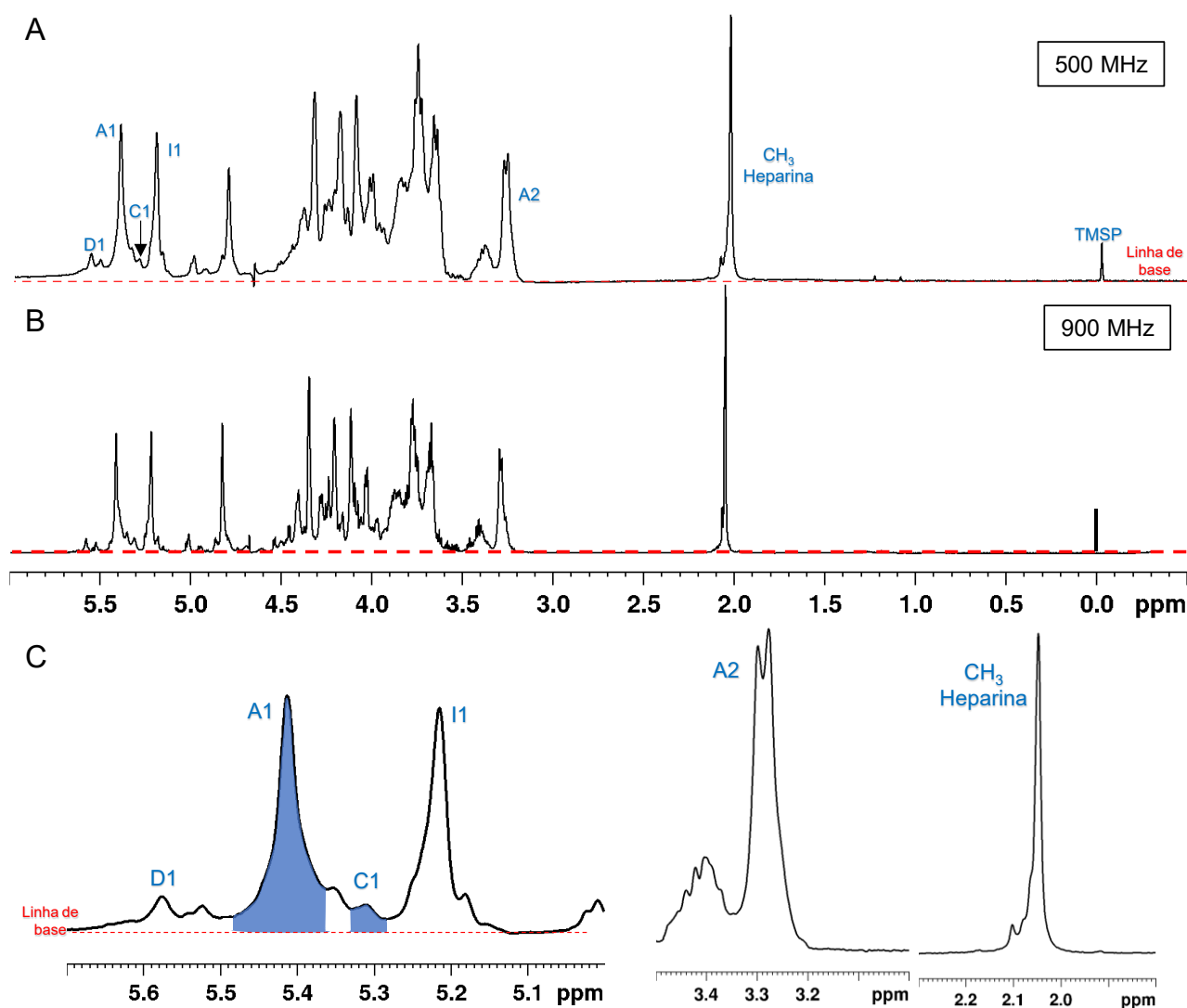


Figura 1 – Espectros de ressonância magnética nuclear unidimensional de próton a 900 MHz (Painel Superior) e 500 MHz (Painel intermediário). O painel inferior mostra a expansão da região indicada do espectro a 900 MHz.

Os sinais designados como A1 e A2 correspondem ao H1 e H2 das unidades de α -glucosamina 6- e N-disulfatadas em 5,40 e 3,28 ppm, respectivamente; o sinal I1 corresponde ao H1 do ácido α - idurônico 2-sulfatado em 5,21 ppm; C1 corresponde ao H1 das unidades de α -glucosamina N-sulfatada em 5,31 ppm; e metil da glucosamina N-acetilada em 2,05 ppm. Os valores de ppm observados para cada sinal não devem variar de $\pm 0,03$ ppm. No painel inferior são mostradas as expansões das regiões utilizadas para o cálculo do critério de aceitação (em azul). O intervalo entre 5,70 e 5,00 ppm indica a correta integração dos sinais A1 e C1.

C. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 202 nm ou 215 nm, desde que atenda à adequabilidade do sistema; pré-coluna de 50 mm de comprimento e 2,0 mm de diâmetro interno, empacotada com resina trocadora de ânions com partículas porosas de 13 μm e poro de 10 Å (compatível com a coluna analítica); coluna analítica de 250 mm de comprimento e 2,0 mm de diâmetro interno, empacotada com resina trocadora de ânions, composta por um copolímero de etilvinilbenzeno/divinilbenzeno, com partículas porosas de 9 μm e poro de 2000 Å, revestida por microesferas de látex de 70 nm funcionalizadas com íons de amônio quaternário alcano, mantida a 40 °C; fluxo da *Fase móvel* de 0,5 mL/minuto. A coluna deve ser equilibrada por, pelo menos, 30 minutos com *Eluente A* da *Fase móvel* antes do início da análise.

Eluente A: preparar solução de TRIS a 20 mM. Ajustar o pH para 7,4 com ácido clorídrico diluído. Filtrar utilizando uma membrana de tamanho de poro de 0,22 μm e desaerar por pelo menos 15 minutos antes de usar.

Eluente B: preparar solução de TRIS a 20 mM e NaCl a 2,5 M. Ajustar o pH para 7,4 com ácido clorídrico diluído. Filtrar utilizando uma membrana de tamanho de poro de 0,22 µm e desaerar por pelo menos 15 minutos antes de usar.

Gradiente da fase móvel: adotar sistema de gradiente descrito na tabela a seguir:

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Eluente A (%)</i>	<i>Eluente B (%)</i>	<i>Eluição</i>
0 – 4	83,4	16,6	equilíbrio
4 – 20	83,4→0	16,6→100	gradiente linear
20 – 22	0	100	isocrática
22 – 40	83,4	16,6	equilíbrio

Solução amostra (a): solução a 20 mg/mL da amostra em água destilada.

Solução amostra (b): adicionar 60 µL da *Solução amostra (a)* a 240 µL de água destilada no momento de realizar o ensaio. Concentração final de 4mg/mL

Solução amostra (c): misturar 50 µL da *Solução amostra (a)* com 50 µL de nitrito de sódio 2 M e 50 µL de ácido sulfúrico 0,5 M. Misturar suavemente e após 60 minutos à temperatura ambiente, adicionar 50 µL de hidróxido de sódio 1 M para interromper a reação. Adicionar 50 µL de água destilada para ajustar a concentração.

Solução de referência (a): solução a 20 mg/mL do padrão de identificação de heparina sódica SQR em água destilada.

Solução de referência (b): adicionar 60 µL da *solução de referência (a)* a 240 uL de água destilada no momento de realizar o ensaio.

Solução de referência (c): solução a 10 mg/mL de sulfato de dermatam SQR em água destilada.

Solução de referência (d): solubilizar sulfato de condrotina supersulfatado SQR na concentração de 10 mg/mL em água destilada.

Solução de referência (e): misturar 100 µL da *Solução de referência (a)* com 30 µL *Solução de referência (c)* e 20 µL da *Solução de referência (d)*. Completar o volume para 500 µL com água destilada.

Solução de referência (f): misturar 50 µL da *Solução de referência (a)* com 50 µL de nitrito de sódio 2 M e 50 µL de ácido sulfúrico 0,5 M. Misturar suavemente e, após 60 minutos à temperatura ambiente, adicionar 50 µL de hidróxido de sódio 1 M para interromper a reação. Adicionar 50 µL de água destilada para ajustar a concentração.

Solução de referência (g): misturar 50 µL da *Solução de referência (a)* com 15 µL da *Solução de referência (c)* e 10 µL da *Solução de referência (d)*. A essa mistura, adicionar 50 µL de nitrito de sódio 2 M e 50 µL de ácido sulfúrico 0,5 M. Misturar suavemente e, após 60 minutos à temperatura ambiente, adicionar 50 µL de hidróxido de sódio 1 M para interromper a reação. Adicionar 25 µL de água destilada para ajustar a concentração.

Injetar, separadamente, 50 µL das *Soluções de referência (e), (f) e (g)* e registrar os cromatogramas. Para a *Solução de referência (e)*, a relação entre a altura do pico do sulfato de dermatam e o vale (linha de base entre os picos de sulfato de dermatam e heparina suína) é de, no mínimo, 2,0. Os tempos de retenção relativa são cerca de 0,8 para o sulfato de dermatam, 1,0 para a heparina sódica suína e cerca de 1,1 para o sulfato de condroitina supersulfatado (Figura 2B). O cromatograma obtido com a *Solução de referência (f)* não apresenta nenhum pico no tempo de retenção da heparina. O cromatograma obtido com a *Solução de referência (g)* deve apresentar os picos referentes ao sulfato de dermatam e ao sulfato de condroitina supersulfatado visualmente distintos (Figura 2C, em preto).

Procedimento: injetar, separadamente, 50 µL das *Soluções amostra (b) e (c)* e 50 µL da *Solução de referência (b)*. O pico referente à heparina sódica suína obtido no cromatograma da *Solução amostra (b)* deve ser semelhante em forma e tempo de retenção ao pico obtido no cromatograma da *Solução de referência (b)* (Figura 2A). Não deve ser detectado nenhum pico no tempo de retenção do sulfato de condroitina supersulfatado no cromatograma da *Solução amostra (b)*. Nenhum pico deve ser detectado no tempo de retenção da heparina no cromatograma da *Solução amostra (c)* (Figura 2C, em azul).

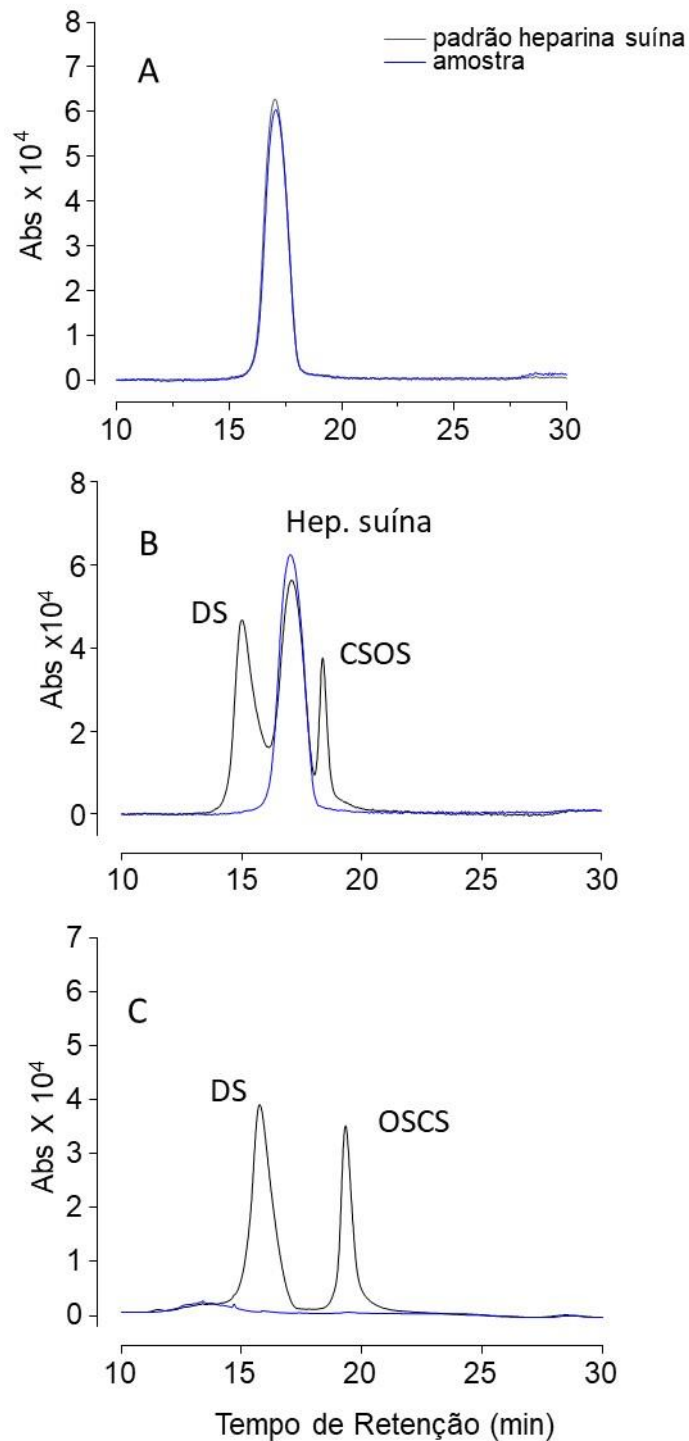


Figura 2 – Perfil de eluição da heparina sódica suína na cromatografia líquida em coluna de troca iônica.

O painel A mostra a eluição do padrão de heparina suína SQR (em preto) e da amostra-teste (em azul). O painel B mostra a eluição de uma mistura de padrões (em preto) e da amostra-teste (em azul). O painel C mostra a eluição da mistura de padrões (em preto) e da amostra-teste (em azul) após o tratamento com ácido nítrico

D. Determinação de Peso Molecular.

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector de índice de refração; pré-coluna de 4,0 cm de comprimento e 6,0

mm de diâmetro interno, empacotada com matriz de sílica de 7 µm de diâmetro; coluna de 30 cm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno, empacotada com matriz de sílica de 3 µm com poro de 500 Å em série com uma coluna de 30 cm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno, empacotada com matriz de sílica de 3 µm com poro de 290 Å. Como alternativa, podem ser utilizadas duas colunas com as mesmas medidas (30 cm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno), a primeira com matriz de sílica de 8 µm e poro de 450 Å seguida de uma coluna com matriz de sílica de 5 µm e poro de 250 Å, mantida a 40 °C; fluxo da *Fase móvel* de 0,3 mL/minuto.

Fase móvel: acetato de amônio 0,1 M, pH 6,0.

Solução amostra: solução da amostra a 10 mg/mL em *Fase móvel*.

Solução padrão: solução a 10 mg/mL em *Fase móvel* do padrão de calibração de peso molecular para heparina não fracionada SQR.

Solução de adequação do sistema: solução a 10 mg/mL em *Fase móvel* do padrão de heparina para identificação SQR na concentração de 10 mg/mL preparada no momento de realizar o ensaio.

Injetar 20 µL da *Solução de adequação do sistema*. Registrar o cromatograma pelo período de tempo necessário para a completa eluição da amostra e do pico atribuído ao sal. O peso molecular médio (M_w) calculado para a *Solução de adequação do sistema* deve ser arredondado para o valor da centena mais próximo. O valor encontrado deve ser de ± 500 Da do valor de M_w estabelecido para o padrão de identificação.

Deve haver resolução da linha de base entre os picos da heparina e do pico atribuído ao sal. O coeficiente de regressão linear da curva de calibração não deve ser menor que 0,99, utilizando uma equação polinomial de terceira ordem.

Procedimento: injetar, separadamente, 20 µL da *Solução padrão* e da *Solução amostra* e registrar os cromatogramas pelo período de tempo necessário para a completa eluição da amostra e do pico atribuído ao sal. Calcular a área total sob o pico de heparina no cromatograma da solução de calibração e a área cumulativa em cada ponto sob o pico como porcentagem do total. Não incluir o pico de sal. Usando a tabela fornecida para o calibrante de peso molecular para heparina, identificar os pontos no cromatograma para o qual a área percentual cumulativa está mais próxima das frações percentuais listadas na tabela e atribuir o peso molecular da tabela ao tempo de retenção (t_R) correspondente no cromatograma. Para a curva de calibração, os dados obtidos devem ser plotados em um gráfico como \log do peso molecular em função do tempo de retenção (t_R), obedecendo a uma equação polinomial de terceira ordem. Utilizar um software de cromatografia de filtração em gel (GPC) ou encontrar os valores de a , b , c e d da equação de forma que \log do peso molecular = $a + b(t_R) + c(t_R)^2 + d(t_R)^3$. Com os parâmetros obtidos, calcular o peso molecular aproximado para cada tempo de eluição da cromatografia.

Utilizando a função de calibração derivada como descrito acima, calcular o peso molecular médio (M_w) de acordo com a seguinte fórmula:

$$M_w = \sum(RI_i \cdot M) / \sum RI_i$$

em que a resposta do detector em cada ponto é definida como RI e o peso molecular em cada ponto é definido como M.

Determinar para o cromatograma da amostra-teste a porcentagem de heparina com peso molecular na faixa de 8000 a 16000 ($M_{8000 \rightarrow 16000}$), a porcentagem de heparina com peso molecular na faixa de

16000 a 24000 ($M_{16000 \rightarrow 24000}$) e a porcentagem de heparina com peso molecular superior a 24000 ($M_{>24000}$). Arredondar os valores percentuais médios para o 1% mais próximo. O M_w obtido deve estar entre 15000 e 19000. O valor de $M_{>24.000}$ deve estar abaixo de 20%, e a razão $M_{8000 \rightarrow 16000} / M_{16000 \rightarrow 24000}$ deve ser acima de 1,0.

ENSAIOS DE PUREZA

Limite de galactosamina no total de hexosamina. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector amperométrico pulsado; coluna guarda de 3 cm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno seguida de coluna analítica de 15 cm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno, empacotada com copolímero de etilvinilbenzeno/divinilbenzeno (6,5 μ m diâmetro) aglomerado com microesferas de 130 nm de látex funcionalizadas com amina quaternária, mantida a 30 °C; fluxo da *Fase móvel* de 0,5 mL/minuto. A coluna deve ser equilibrada por, pelo menos, 60 minutos com *Fase móvel* antes do início da análise e, por 10 minutos, antes de cada injeção. A coluna deve ser limpa passando-se hidróxido de potássio 100 mM por pelo menos 10 minutos após cada injeção.

Fase móvel: hidróxido de potássio 14 mM.

Solução amostra: transferir 12 mg da amostra para um tubo de ensaio com tampa de rosca de 7 mL, dissolver em 5 mL de ácido clorídrico 5 M e tampar.

Solução amostra hidrolisada: aquecer a *Solução amostra* por 6 horas a 100 °C. Resfriar à temperatura ambiente e diluir com água (1:100).

Solução padrão de glucosamina: cloridrato de glucosamina SQR a 1,6 mg/mL em ácido clorídrico 5 M.

Solução padrão de galactosamina: cloridrato de galactosamina SQR a 16 μ g/mL em ácido clorídrico 5 M.

Solução padrão: misturar volumes iguais da *Solução padrão de glucosamina* e da *Solução padrão de galactosamina*.

Solução padrão hidrolisada: transferir 5 mL da *Solução padrão* para um tubo de ensaio com tampa de rosca de 7 mL e aquecer por 6 horas a 100 °C. Resfriar à temperatura ambiente e diluir com água (1:100).

Injetar replicatas de 10 μ L da *Solução padrão hidrolisada*. A resolução entre os picos de galactosamina e glucosamina é, no mínimo, 2,0. A eficiência da coluna é, no mínimo, 2000 pratos teóricos, em relação ao pico da glucosamina. O fator de cauda para os picos de galactosamina e glucosamina é entre 0,8 e 2,0.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 μ L da *Solução padrão hidrolisada* e da *Solução amostra hidrolisada*, registrar os cromatogramas por 10 minutos e medir as áreas sob os picos de galactosamina e de glucosamina. Calcular a razão de resposta de galactosamina para glucosamina ($GalN_R$) na *Solução padrão hidrolisada*, utilizando a fórmula:

$$\text{Resultado: } \left(\frac{GalN_B}{GalN_W} \right) \times \left(\frac{GlcN_W}{GlcN_B} \right)$$

em que,

$GalN_B$ = área sob o pico de galactosamina da *Solução padrão hidrolisada*.

$GalN_W$ = peso de galactosamina para a *Solução padrão*.

$GlcN_W$ = peso de glucosamina para a *Solução padrão*.

$GlcN_B$ = área sob o pico de glucosamina da *Solução padrão hidrolisada*.

Calcule a porcentagem de galactosamina na hexosamina total, utilizando a fórmula:

$$Resultado = \left\{ \frac{\left[\frac{(GalN_U)}{(GalN_R)} \right]}{\left[\left(\frac{(GalN_U)}{(GalN_R)} \right) + GlcN_U \right]} \right\} \times 100$$

em que,

$GalN_U$ = área sob o pico de galactosamina da *Solução amostra hidrolisada*.

$GalN_R$ = razão de resposta de galactosamina para glucosamina ($GalN_R$) na *Solução padrão hidrolisada*.

$GlcN_U$ = área sob o pico de glucosamina da *Solução amostra hidrolisada*.

A porcentagem da área sob o pico de galactosamina da hexosamina total da *Solução amostra hidrolisada* não é maior que 1,0%.

pH (5.2.19). 5,0 a 8,0. Determinar em solução aquosa a 1% (p/v).

Proteínas.

A. Adicionar cinco gotas de ácido tricloroacético a 20% (p/v) em 1 mL de solução aquosa da amostra a 1% (p/v). Não deve formar precipitado ou turbidez.

B. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria no ultravioleta, visível, e infravermelho (5.2.14)*.

Solução A: misturar dois volumes de hidróxido de sódio 1% com dois volumes de carbonato de sódio 5% e diluir para cinco volumes com água.

Solução B: misturar dois volumes de sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 1,25% com dois volumes de tartarato de sódio ($C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$) 2,98% e diluir para cinco volumes com água.

Solução C: misturar um volume da *Solução B* com 50 volumes da *Solução A*.

Solução D: diluir adequadamente o reagente fosfomolibdotúngstico em água de modo que as soluções amostra e padrão tenham o valor de pH entre 10,00 e 10,50 após adição das *Soluções C e D*.

Solução amostra: preparar solução da amostra de concentração de 5 mg/mL em água.

Solução referência: preparar solução de albumina bovina R (cerca de 96% de proteína) de concentração de 100 mg/mL em água. Fazer diluições com água de maneira a obter, no mínimo, cinco soluções referência tendo concentrações de proteína distribuídas uniformemente na faixa de 5 µg/mL a 100 µg/mL.

Procedimento: adicionar 5 mL da *Solução C* para cada 1 mL das *Soluções referências, Solução*

amostra e branco (água), respectivamente. Deixar em repouso por 10 minutos. Adicionar 0,5 mL da *Solução D*, misturar e deixar em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Medir as absorvâncias das soluções a 750 nm, utilizando a solução branco para ajuste do zero.

Curva de calibração: a relação da absorvância e concentração de proteína não é linear. Contudo, se a faixa de concentração utilizada para traçar a curva padrão for suficientemente pequena, em último caso se aproximará da linearidade. Construir uma curva padrão, plotando as absorvâncias das soluções referência contra suas concentrações, utilizando regressão linear, traçar uma reta linear de melhor ajuste aos pontos plotados. Determinar a concentração de proteína na solução amostra, por meio de sua absorvância e da curva padrão. No máximo 0,5% em relação à substância dessecada.

Impurezas nucleotídicas. Dissolver 40 mg em 10 mL de água. A absorvância é medida a 260 nm e o resultado deve ser, no máximo, 0,15.

Nitrogênio (5.3.3.2). Utilizar o *Método I, macrodeterminação*. No mínimo, 1,5% e, no máximo, 2,5% de nitrogênio, calculado em relação à substância dessecada.

Sódio. Entre 10,5% a 13,5% de sódio determinado conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção atômica (5.2.13.1)*.

Perda por dessecação (5.2.9.1). Determinar em estufa a vácuo a 60 °C por três horas. No máximo, 8%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo, 0,03 UE/UI de heparina sódica suína.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Método I

Atividade antifator IIa

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4: dissolver quantidades de tris (hidroximetil) aminometano para obter concentração de 20 mM, cloreto de sódio para 150 mM em água destilada contendo macrogol 8000 a 0,1%. Se necessário, ajustar o pH para 7,4 com solução diluída de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

Solução de antitrombina humana: reconstituir o conteúdo da ampola de antitrombina humana conforme recomendado pelo fabricante. Homogeneizar. Diluir com *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, de modo a obter solução 0,02 UI/mL (equivalente a 40 nM) de antitrombina humana.

Solução de fator IIa humano: reconstituir o conteúdo do frasco conforme recomendado pelo fabricante. Diluir a solução obtida em *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, de modo a obter solução a 2,0 UI/mL (equivalente a 20 nM) de fator IIa humano.

Solução de substrato cromogênico para fator IIa humano: dissolver quantidade de dicloridrato de H-D-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-4-nitroanilida (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl) em água destilada estéril obtendo solução 2 mM. Antes do uso, diluir em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter a solução 0,4 mM. Proceder ao abrigo de luz direta.

Solução de parada: preparar uma solução a 50% (v/v) de ácido acético em água.

Solução padrão: utilizar solução padrão de heparina sódica suína SQR. Reconstituir o conteúdo da ampola de heparina sódica suína SQR conforme recomendado pelo fabricante e misturar levemente até completa dissolução. A partir da solução reconstituída, preparar diluições em solução *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, de forma a obter pelo menos dez soluções com concentração variando entre 0,1 e 0,0001 UI/mL. As concentrações utilizadas devem apresentar, no mínimo, cinco pontos dentro de uma faixa linear. A faixa de concentração utilizada pode ser adaptada para contemplar essa linearidade.

Solução amostra: dissolver quantidade da amostra em *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter soluções com atividades aproximadamente iguais às da solução heparina sódica suína SQR.

Procedimento: dois diferentes tipos de medições podem ser realizados, a *medição cinética* e a *medição “endpoint”*.

Medição cinética: os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo as proporções entre as preparações de padrão, amostra em teste e reagentes. Executar o teste em microplacas e realizar a leitura espectrofotométrica a 405 nm em um leitor de microplacas a 37 °C. O ensaio deve ser realizado com cada solução de heparina SQR e solução amostra em duplicata. Em cada poço da microplaca adicionar: 40 µL de *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* ou 40 µL da *Solução padrão* ou 40 µL da *Solução amostra*; 25 µL da *Solução de antitrombina humana* e 10 µL da *Solução de fator IIa humano*. Após dois minutos de incubação a 37 °C, adicionar 25 µL da *Solução de substrato cromogênico para fator IIa humano*. Registrar a absorvância medida em 405 nm contra o branco durante cinco minutos. O branco é o teste realizado na ausência da adição de heparina, utilizando 40 µL de *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*.

Medição “endpoint”: Após a adição da *Solução de substrato cromogênico para fator IIa humano* registrar a absorvância medida a 405nm e determinar o tempo para a adição da *Solução de parada* com base na linearidade da relação dose-resposta. Estabelecido o referido tempo, proceder a mesma reação seguida de adição de 50 µL de *Solução de parada*.

Os modelos estatísticos para análise da relação entre inclinação das retas ou sobre paralelismo devem ser usados escolhendo o melhor modelo que descreva a correlação entre a concentração e a resposta.

Ensaio sobre paralelismo: para cada série, calcular a regressão da absorvância ou mudança de absorvância/minuto contra as concentrações em escala logarítmica das soluções de amostra e das soluções de padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de linhas paralelas. Expressar a potência da heparina sódica suína em UI/mg, de base seca.

Relação entre inclinação das retas: para cada série, calcular a regressão da absorvância em logaritmo ou o logaritmo das alterações na absorção por minuto contra as concentrações das soluções de amostra e das soluções de padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de relação entre inclinação das retas. Expressar a potência da heparina sódica suína em UI/mg, de base seca.

Crêterios de aceitação: a potência da heparina sódica suína deve apresentar, no mínimo, 180 UI da atividade antifator IIa por mg.

Atividade antifator Xa

Proceder conforme descrito em *Atividade antifator IIa*, com exceção da *Solução de fator IIa humano*, que deve ser trocada por *Solução de fator Xa humano* e da *Solução de substrato cromogênico* dicloridrato de H-D-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-4-nitroanilida (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl), que deve ser trocada pela *Solução de substrato cromogênico* dicloridrato de N- α -benziloxycarbonil-D-arginil-L-glicil-L-arginina-4-nitroanilida (N- α -Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA.2HCl). O tampão a ser utilizado nesse ensaio é *tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, porém com adição de cloreto de cálcio 10 mM. Preparar a *Solução de fator Xa humano* e a *Solução de substrato cromogênico para fator Xa humano* como descrito a seguir.

Solução de fator Xa humano: reconstituir o conteúdo do frasco conforme recomendado pelo fabricante. Diluir a solução obtida em *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4 com adição de cloreto de cálcio*, de modo a obter solução a 1,0 UI/mL (equivalente a 20 nM).

Solução de substrato cromogênico para fator Xa humano: dissolver quantidade de dicloridrato de N- α -benziloxycarbonil-D-arginil-L-glicil-L-arginina-4-nitroanilida (N- α -Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA.2HCl) em água destilada estéril obtendo solução 2 mM. Antes do uso, diluir em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter a solução 0,4 mM. Proceder ao abrigo de luz direta.

Proceder com as análises estatísticas e cálculos indicados em *Atividade antifator IIa*.

Crítérios de aceitação: a potência da heparina sódica suína deve apresentar, no mínimo, 180 UI da atividade antifator IIa por mg. A razão da atividade antifator Xa/antifator IIa deve ser, no mínimo, 0,9 e, no máximo, 1,1.

B. Método II**Atividade antifator IIa**

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4: dissolver 6,10 g de tris (hidroximetil) aminometano, 10,2 g de cloreto de sódio, 2,8 g edetato de sódio e 10,0 g de macrogol 6000 em 800 mL de água destilada. Ajustar o pH para 8,4 com solução diluída de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio e completar com água para 1000mL

Solução de antitrombina humana: reconstituir o conteúdo da ampola de antitrombina conforme recomendado pelo fabricante. Homogeneizar e diluir com *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de modo a obter uma solução de antitrombina a 5,0 UI/mL. Diluir com o mesmo tampão para se obter uma concentração de 0,125 UI/mL.

Solução de trombina humana: reconstituir o conteúdo da ampola de trombina humana (fator IIa) em água destilada para uma concentração de 20 UI/mL e diluir em *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de modo a obter uma solução de trombina a 5,0 UI/mL.

Solução de substrato cromogênico: diluir um substrato cromogênico de trombina para teste amidolítico em água para que se obtenha 1,25 mM.

Solução de parada: preparar uma solução a 20% (v/v) de ácido acético em água.

Solução padrão: reconstituir o conteúdo da ampola do padrão de heparina sódica suína SQR e misturar levemente até completa dissolução. A partir da solução reconstituída, preparar diluições em

solução *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de forma a obter pelo menos quatro soluções com concentração variando entre 0,005 e 0,03 UI/mL.

Solução amostra: dissolver quantidade da amostra em *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4* de modo a obter soluções com atividades aproximadamente iguais às da solução padrão.

Procedimento: os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo as proporções entre as preparações de padrão, amostra em teste e reagentes. O ensaio deve ser realizado com cada solução padrão e solução amostra em duplicata. Os tubos devem ser identificados de acordo com o número de replicatas a serem testadas. Distribuir os brancos nas colunas de forma que representem o comportamento dos reagentes durante o ensaio. O branco é o teste realizado na ausência da adição de heparina, utilizando 50-100 µL de *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*.

Todas as soluções de reagentes, padrão e amostra em teste devem ser pré-aquecidas a 37 °C por 15 minutos antes de serem adicionadas nos tubos. Transferir para cada um dos tubos plásticos, separadamente, um volume fixo (por exemplo, 50-100 µL) de cada uma das diferentes diluições de *Solução padrão*, ou *Solução amostra* ou *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*. Adicionar em cada um dos tubos um volume dobrado da *Solução de antitrombina humana* (100-200 µL). Homogeneizar todos os tubos, suavemente, sem produzir bolhas, e incubar a 37 °C por, no mínimo, um minuto. Adicionar em cada tubo 25-50 µL da *Solução de trombina humana* e incubar a 37 °C por, no mínimo, um minuto. Adicionar 50-100 µL da *Solução de substrato cromogênico*, homogeneizar.

Dois diferentes tipos de medições podem ser realizados, a *medição cinética* e a *medição “endpoint”*.

Medição cinética: registrar a mudança na absorvância para cada solução durante um minuto, medida em 405 nm. Expressar como mudança na absorção por minuto ($\Delta OD/min$) das soluções e dos brancos, os quais devem apresentar valores superiores devido à ausência de heparina. O desvio padrão relativo entre as leituras obtidas com o branco deve ser menor que 10%.

Medição “endpoint”: parar a reação após um minuto com 50-100 µL de solução de parada. Registrar a absorvância de cada solução a 405 nm. O desvio padrão relativo entre as leituras obtidas com o branco deve ser menor que 10%.

Cálculos: os modelos estatísticos para análise da relação entre inclinação das retas ou sobre paralelismo podem ser usados dependendo do modelo que descreva melhor a correlação entre a concentração e a resposta.

Ensaio sobre paralelismo: para cada série, determinar a regressão da absorvância ou mudança de absorvância/minuto contra o logaritmo das concentrações das soluções de amostra e das soluções de padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de linhas paralelas. Expressar a potência da heparina sódica suína em UI/mg, de base seca.

Relação entre inclinação das retas: para cada série, determinar a regressão do logaritmo da absorvância ou o logaritmo das alterações na absorção por minuto contra as concentrações das soluções de amostra e das soluções de padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de relação entre inclinação das retas. Expressar a potência da heparina sódica suína em UI/mg, de base seca

Crítérios de aceitação: a potência da heparina sódica suína deve apresentar, no mínimo, 180 UI da atividade antifator IIa por mg.

Atividade antifator Xa

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4: dissolver quantidades de tris (hidroximetil) aminometano, ácido edético ou edetato de sódio, e cloreto de sódio em água destilada contendo macrogol 6000 a 0,1% para se obter concentrações de 0,05 M; 0,0075 M e 0,175 M, respectivamente. Se necessário, ajustar o pH para 8,4 com solução diluída de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

Solução de antitrombina humana: reconstituir o conteúdo da ampola de antitrombina conforme recomendado pelo fabricante. Homogeneizar e diluir com *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de modo a obter uma solução de antitrombina a 1,0 UI/mL.

Solução de fator Xabovino: reconstituir o conteúdo do frasco conforme recomendado pelo fabricante. Diluir a solução obtida em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de modo a obter uma solução que resulte em 0,65 a 1,25 de absorvância a 405 nm quando testada como descrito abaixo, substituindo os 30 µL de solução de amostra por 30 µL de solução tampão pH 8,4.

Solução de substrato cromogênico: diluir em água um substrato cromogênico para teste amidolítico, específico para o fator Xa, para que se obtenha uma concentração de 1 mM.

Solução de parada: preparar uma solução a 20% (v/v) de ácido acético em água.

Solução padrão: reconstituir o conteúdo da ampola do padrão de heparina sódica suína SQR e misturar levemente até completa dissolução. A partir da solução reconstituída, preparar diluições em solução *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de forma a obter pelo menos cinco soluções com concentração variando entre 0,03 e 0,375 UI/mL de atividade antifator Xa.

Solução amostra: dissolver quantidade da amostra em *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4* de modo a obter soluções com atividades aproximadamente iguais às da solução padrão.

Procedimento: os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo as proporções entre as preparações de padrão, amostra em teste e reagentes. Transferir 120 µL de *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4* para tubos plásticos mantidos a 37 °C. Em cada tubo, separadamente, adicionar 30 µL das diferentes diluições da *Solução padrão* ou da *Solução amostra*. Adicionar em cada tubo 150 µL da *Solução de antitrombina* pré-aquecida a 37 °C por 15 minutos, homogeneizar e incubar por dois minutos. Adicionar 300 µL da *Solução de fator Xa* pré-aquecida a 37 °C por 15 minutos, homogeneizar e incubar por dois minutos. Adicionar 300 µL da *Solução de substrato cromogênico para fator Xa* pré-aquecida a 37 °C por 15 minutos, homogeneizar e, após incubar por dois minutos, adicionar em cada tubo 150 µL da *Solução de parada* e homogeneizar. Para zerar o espectrofotômetro, preparar um branco, adicionando os reagentes em ordem inversa, a partir da *Solução de parada* até a adição final de 150 µL do *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, omitindo a *Solução padrão* e *Solução amostra*. Registrar a absorvância medida em 405 nm contra o branco.

Cálculos: determinar os valores do logaritmo da absorvância contra as concentrações das soluções de amostra e das soluções padrões. Calcular a atividade da amostra usando os métodos estatísticos para o ensaio de relação entre inclinação das retas. Calcular a atividade antifator Xa segundo a equação:

$$P \times (SA/SP)$$

em que,

P = potência da heparina sódica suína padrão de referência;

S_A = inclinação da reta para a *Solução amostra*;

S_P = inclinação da reta para a *Solução padrão*.

Expressar a atividade antifator Xa da heparina sódica suína em UI/mg, de base seca.

Crêterios de aceitaçãõ: calcular a relaçaõ da atividade do antifator Xa contra a potênciã do antifator IIa (antifator Xa / antifator IIa), que deve estar compreendida entre 0,9 e 1,1.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

ROTULAGEM

Observar a legislaçaõ vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Anticoagulante.

HEPARINA SÓDICA SOLUÇÃO INJETÁVEL

A preparação injetável de heparina sódica é uma solução estéril de heparina sódica diluída em água para injeção. A potência anticoagulante é, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 110,0% da a potência declarada no rótulo em unidades por mililitro.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

pH (5.2.19). 5,0 a 7,5.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo 0,03 UE/UI de heparina.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Método I

Atividade antifator IIa

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4: dissolver quantidades de tris (hidroximetil) aminometano para obter concentração de 20 mM, cloreto de sódio para 150 mM em água destilada contendo macrogol 8000 a 0,1%. Se necessário, ajustar o pH para 7,4 com solução diluída de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

Solução de antitrombina humana: reconstituir o conteúdo da ampola de antitrombina humana conforme recomendado pelo fabricante. Homogeneizar. Diluir com *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, de modo a obter solução 0,02 UI/mL (equivalente a 40 nM) de antitrombina humana.

Solução de fator IIa humano: reconstituir o conteúdo do frasco conforme recomendado pelo fabricante. Diluir a solução obtida em *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, de modo a obter solução a 2,0 UI/mL (equivalente a 20 nM) de fator IIa humano.

Solução de substrato cromogênico para fator IIa humano: dissolver quantidade de dicloridrato de H-D-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-4-nitroanilida (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl) em água destilada estéril obtendo solução 2 mM. Antes do uso, diluir em *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter a solução 0,4 mM. Proceder ao abrigo de luz direta.

Solução de parada: preparar uma solução a 50% (v/v) de ácido acético em água.

Solução padrão: utilizar solução padrão de heparina SQR. Reconstituir o conteúdo da ampola de heparina SQR conforme recomendado pelo fabricante e misturar levemente até completa dissolução. A partir da solução reconstituída, preparar diluições em solução *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*, de forma a obter pelo menos dez soluções com concentração variando entre 0,1 e 0,0001 UI/mL. As concentrações utilizadas devem apresentar, no mínimo, cinco pontos dentro de

uma faixa linear. A faixa de concentração utilizada pode ser adaptada para contemplar essa linearidade.

Solução amostra: diluir quantidade da amostra em tampão *tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter soluções com atividades aproximadamente iguais às da solução de heparina SQR.

Procedimento: dois diferentes tipos de medições podem ser realizados, a *Medição cinética* e a *Medição “endpoint”*.

Medição cinética: os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo as proporções entre as preparações de padrão, amostra em teste e reagentes. Executar o teste em microplacas e realizar a leitura espectrofotométrica a 405 nm em um leitor de microplacas a 37 °C. O ensaio deve ser realizado com cada solução de heparina SQR e solução amostra em duplicata. Em cada poço da microplaca, adicionar 40 µL de tampão *tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* ou da solução amostra, 25 µL da *Solução de antitrombina humana* e 10 µL da *Solução de fator IIa humano*. Após dois minutos de incubação a 37 °C, adicionar 25 µL da *Solução de substrato cromogênico para fator IIa humano*. Registrar a absorvância medida em 405 nm contra o branco durante cinco minutos. O branco é o teste realizado na ausência da adição de heparina, utilizando 40 µL de tampão *tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*.

Medição “endpoint”: proceder como descrito na *Medição cinética*. Após a adição do substrato cromogênico, esperar quatro minutos e parar a reação com a adição de 50 µL de *Solução de parada*.

Os modelos estatísticos para análise da relação entre inclinação das retas ou sobre paralelismo devem ser usados escolhendo o melhor modelo que descreva a correlação entre a concentração e a resposta.

Ensaio sobre paralelismo: para cada série, calcular a regressão da absorvância ou mudança de absorvância por minuto contra as concentrações em escala logarítmica das soluções de amostra e das soluções de padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de linhas paralelas. Expressar a potência da heparina sódica em UI/mL.

Relação entre inclinação das retas: para cada série, calcular a regressão da absorvância em logaritmo ou o logaritmo das alterações na absorção por minuto contra as concentrações das soluções de amostra e das soluções de padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de relação entre inclinação das retas. Expressar a potência da heparina sódica em UI/mL.

Crítérios de aceitação: a potência das preparações injetáveis de heparina sódica deve apresentar, no mínimo, 90% e, no máximo, 110% da atividade declarada pelo rótulo. A potência deve ser expressa em UI/mL.

B. Método II

Atividade antifator IIa

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4: dissolver 6,10 g de tris (hidroximetil) aminometano, 10,20 g de cloreto de sódio, 2,80 g edetato de sódio e, se necessário, 0 a 10,0 g de macrogol 6000 e/ou 2,0 g de albumina sérica bovina ou humana em 800 mL de água destilada. Ajustar o pH para 8,4 com solução diluída de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio e completar com água para 1 000 mL.

Solução de antitrombina: reconstituir o conteúdo da ampola de antitrombina conforme recomendado pelo fabricante. Homogeneizar e diluir com *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de modo a obter uma solução de antitrombina a 5,0 UI/mL. Diluir com o mesmo tampão para se obter uma concentração de 0,125 UI/mL.

Solução de trombina humana: reconstituir o conteúdo da ampola de trombina humana (fator IIa) em água destilada para uma concentração de 20 UI/mL e diluir em *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de modo a obter uma solução de trombina a 5,0 UI/mL.

Solução de substrato cromogênico: diluir um substrato cromogênico de trombina para teste amidolítico em água para que se obtenha 1,25 mM.

Solução de parada: preparar uma solução a 20% (v/v) de ácido acético em água.

Solução padrão: reconstituir o conteúdo da ampola de heparina sódica padrão de referência primário ou secundário e misturar levemente até completa dissolução. A partir da solução reconstituída, preparar diluições em solução *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de forma a obter pelo menos quatro soluções com concentração variando entre 0,005 e 0,03 UI/mL.

Solução amostra: dissolver quantidade da amostra em tampão *tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4* de modo a obter soluções com atividades aproximadamente iguais às da solução padrão.

Procedimento: os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo as proporções entre as preparações de padrão, amostra em teste e reagentes. O ensaio deve ser realizado com cada solução de heparina e solução amostra em duplicata. Os tubos devem ser identificados de acordo com o número de replicatas a serem testadas. Distribuir os brancos nas colunas de forma que representem o comportamento dos reagentes durante o ensaio. O branco é o teste realizado na ausência da adição de heparina, utilizando 50 µL a 100 µL de *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*.

Todas as soluções de reagentes, padrão e amostra em teste devem ser pré-aquecidas a 37 °C por 15 minutos antes de serem transferidas para os tubos. Transferir para cada um dos tubos plásticos, separadamente, um volume fixo (por exemplo, 50 µL a 100 µL) de cada uma das diferentes diluições de *Solução padrão*, ou *Solução amostra* ou *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*. Adicionar em cada um dos tubos um volume dobrado da *Solução de antitrombina* (100 a 200 µL). Homogeneizar todos os tubos, suavemente, sem produzir bolhas, e incubar a 37 °C por, no mínimo, um minuto. Adicionar em cada tubo 25 µL a 50 µL da *Solução de trombina humana* e incubar a 37 °C por, no mínimo, um minuto. Adicionar 50 µL a 100 µL da *Solução de substrato cromogênico*, homogeneizar.

Dois diferentes tipos de medições podem ser realizados, a *Medição cinética* e a *Medição “endpoint”*.

Medição cinética: registrar a mudança na absorvância para cada solução durante um minuto, medida em 405 nm. Expressar como mudança na absorção por minuto ($\Delta OD/min$) das soluções e dos brancos, os quais devem apresentar valores superiores devido à ausência de heparina. O desvio padrão relativo entre as leituras obtidas com o branco deve ser menos que 10%.

Medição “endpoint”: parar a reação após um minuto com 50 µL a 100 µL de *Solução de parada*. Registrar a absorvância de cada solução a 405 nm. O desvio padrão relativo entre as leituras obtidas com o branco deve ser menor que 10%.

Cálculos: os modelos estatísticos para análise da relação ente inclinação das retas ou sobre paralelismo podem ser usados dependendo do modelo que descreva melhor a correlação entre a concentração e a resposta.

Ensaio sobre paralelismo: para cada série, determinar a regressão da absorvância ou mudança de absorvância por minuto contra o logaritmo das concentrações das soluções de amostra e das soluções de padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de linhas paralelas. Expressar a potência da heparina sódica em UI/mL.

Relação entre inclinação das retas: para cada série, determinar a regressão do logaritmo da absorvância ou o logaritmo das alterações na absorção por minuto contra as concentrações das soluções de amostra e das soluções de padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de relação entre inclinação das retas. Expressar a potência da heparina sódica em UI/mL.

Crítérios de aceitação: a potência das preparações injetáveis de heparina sódica deve apresentar, no mínimo, 90% e, no máximo, 110% da atividade declarada pelo rótulo. A potência deve ser expressa em UI/mL.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Observar a legislação vigente.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Anticoagulante.

Nota: pode ser necessário aplicar a mistura da Preparação do ensaio com a Preparação de identificação.

B. Determinação dos fragmentos peptídicos. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 214 nm; coluna de 100 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (1,5 µm a 10 µm), mantida a temperatura de 40 °C; fluxo da *Fase móvel* de 1,0 mL/minuto.

Tampão sulfato: misturar volumes iguais de sulfato de amônio 2 M e ácido sulfúrico 0,5 M e filtrar.

Solução enzimática: preparar uma solução de protease *Staphylococcus aureus* V-8 em água, contendo uma atividade de 500 UI/mL.

Tampão HEPES: dissolver 2,38 g de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico) em cerca de 90 mL de água em um balão volumétrico de 100 mL. Ajustar o pH para 7,5 utilizando hidróxido de sódio 5 M. Diluir com água até completar o volume do balão e misturar.

Eluente A: preparar uma mistura filtrada e desgaseificada de 100 mL de acetonitrila, 700 mL de água e 200 mL de *Tampão sulfato*.

Eluente B: preparar uma mistura filtrada e desgaseificada de 400 mL de acetonitrila, 400 mL de água e 200 mL de *Tampão sulfato*.

Solução padrão de digestão: dissolver, conforme a espécie indicada, 6 mg de insulina SQR em 3 mL de ácido clorídrico 0,01 M e transferir 500 µL da solução resultante para um frasco limpo. Adicionar 2 mL de *Tampão HEPES* e 400 µL de *Solução enzimática* e incubar a 25 °C durante seis horas. Interromper a digestão pela adição de 2,9 mL de *Tampão sulfato*.

Solução teste de digestão: para 1 mg de insulina, adicionar 500 µL de ácido clorídrico 0,01 M e misturar para dissolver. Proceder conforme indicado para *Solução padrão de digestão*, iniciando por “adicionar 2 mL de *Tampão HEPES*”.

Gradiente da Fase móvel: adotar o sistema de gradiente descrito na tabela a seguir.

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Eluente A (%)</i>	<i>Eluente B (%)</i>	<i>Eluição</i>
0	90	10	equilíbrio
0 – 60	90 → 30	10 → 70	gradiente linear
60 – 65	30 → 0	70 → 100	gradiente linear
65 – 70	0	100	isocrática
70 – 71	0 → 90	100 → 10	gradiente linear
71 – 86	90	10	reequilíbrio

Procedimento: injetar, separadamente, volumes iguais de *Solução padrão de digestão* e *Solução teste de digestão*, registrar os cromatogramas e medir a área sob os picos. O perfil cromatográfico da *Solução teste de digestão* corresponde àquele da *Solução padrão de digestão*. Realizar ensaio em branco e fazer as correções necessárias. O fator de cauda é, no máximo, 1,5. A resolução entre os picos do fragmento de digestão II e do fragmento de digestão III é, no mínimo, 1,9.

Nota: *fragmento I elui ao mesmo tempo na insulina derivada de suínos e insulina humana; fragmento II elui ao mesmo tempo em todas as insulinas; e fragmento III elui ao mesmo tempo na insulina derivada de bovinos e suínos.*

Nota: *o volume a ser injetado é dependente da resolução do equipamento. Deve ser injetado um volume necessário para obtenção da separação e resolução dos picos.*

CARACTERÍSTICAS

Perda por dessecação (5.2.9.1). Determinar em 0,2 g da amostra. Dessecar em estufa a 105 °C, por 16 horas. No máximo 10%.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.11.3)*. Determinar o teor de zinco de cerca de 10 mg da amostra, pesada com exatidão. No máximo, 1,0%, calculado na base seca.

ENSAIOS DE PUREZA

Substâncias relacionadas. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 214 nm; coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (1,5 µm a 10 µm), mantida a temperatura de 40 °C; fluxo da *Fase móvel* de 1,0 mL/minuto.

Diluyente: dissolver 28,4 g de sulfato de sódio anidro em 1000 mL de água. Adicionar 2,7 mL de ácido fosfórico. Ajustar, se necessário, o pH para 2,3 utilizando etanolamina e homogeneizar.

Eluente A: preparar uma mistura filtrada e desgaseificada do *Diluyente* e acetonitrila (82:18).

Eluente B: preparar uma mistura filtrada e desgaseificada do *Diluyente* e acetonitrila (50:50).

Gradiente da *Fase móvel:* adotar o sistema de gradiente descrito na tabela a seguir:

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Eluente A (%)</i>	<i>Eluente B (%)</i>	<i>Eluição</i>
0	81	19	equilíbrio
0 – 60	81	19	isocrática
60 – 85	81 → 36	19 → 64	gradiente linear
85 – 91	36	64	isocrática
91 – 92	36 → 81	64 → 19	gradiente linear

Solução amostra: transferir cerca de 7,5 mg de insulina para um frasco que tenha tampa adequada e adicionar 2 mL de ácido clorídrico 0,01 M. Tampar o frasco e agitar, gentilmente, para dissolução.

Nota: *a Solução amostra pode ser armazenada em temperatura ambiente por até duas horas e em refrigeração por até 12 horas.*

Solução padrão A: dissolver uma quantidade, pesada com exatidão, das espécies apropriadas de insulina SQR em ácido clorídrico 0,01 M para obter uma solução com uma concentração conhecida de cerca de 3,75 mg/mL.

Solução padrão B: pipetar 1 mL da *Solução padrão A*, transferir para um balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com ácido clorídrico 0,01 M e homogeneizar.

Solução padrão C: pipetar 1 mL da *Solução padrão B*, transferir para um balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com ácido clorídrico 0,01 M e homogeneizar.

Nota: as três soluções padrão podem ser armazenadas em temperatura ambiente por até 12 horas e em refrigerador por até 48 horas.

Solução de adequação do sistema: proceder conforme descrito para a *Solução de adequação do sistema* no *Método físico-químico em Doseamento*.

Ajustar a composição da *Fase móvel* e a duração da eluição isocrática para obter um tempo de retenção de cerca de 31 minutos para a insulina, com a eluição da insulina desamido A-21 pouco antes do início da fase de eluição por gradiente linear. Injetar a *Solução padrão A*, *Solução padrão B* e *Solução padrão C*, registrar os cromatogramas e medir as respostas de pico conforme indicado no *Procedimento*. Calcular o fator X_1 (dez vezes a razão entre as áreas da *Solução padrão B* pela *Solução padrão A*) segundo a expressão:

$$10 \times \left(\frac{r_B}{r_A} \right)$$

em que,

r_B = área de resposta de pico obtido para a *Solução padrão B*;

r_A = área de resposta de pico obtido para a *Solução padrão A*.

O valor de X_1 deve estar entre 0,91 e 1,09.

Calcular o fator X_2 (cem vezes a razão entre as áreas da *Solução padrão C* pela *Solução padrão A*) segundo a expressão:

$$100 \times \left(\frac{r_C}{r_A} \right)$$

em que,

r_C = área de respostas de pico obtido para a *Solução padrão C*;

r_A = área de respostas de pico obtido para a *Solução padrão A*.

O valor de X_2 deve estar entre 0,7 e 1,3.

Injetar a *Solução de adequação do sistema* e registrar as respostas de pico conforme indicado em *Procedimento*. A resolução, R , entre insulina e insulina desamido A-21 é, no mínimo, 2,0. O fator de cauda para o pico de insulina é, no máximo, 1,8.

Nota: o volume a ser injetado é dependente da resolução do equipamento. Deve ser injetado um volume necessário para obtenção da separação e resolução dos picos.

Procedimento: injetar um volume de cerca de 20 μ L da *Solução amostra*, registrar o cromatograma e medir as áreas de respostas para o pico de insulina principal, o pico de insulina desamido A-21 e

picos de quaisquer outras impurezas. Calcular a porcentagem de insulina (%I), na parcela de insulina utilizada segundo a expressão:

$$\%I = 100 \times \left(\frac{r_I}{r_S} \right)$$

em que,

r_I = a resposta, em área, sob o pico de insulina.

r_S = a soma das respostas, em área, sob todos os picos.

Calcular a porcentagem de insulina desamido A-21 (%D) na parcela de insulina utilizada, segundo a expressão:

$$\%D = 100 \times \left(\frac{r_D}{r_S} \right)$$

em que,

r_D = a resposta, em área, sob o pico de insulina desamido A-21.

r_S = a soma das respostas, em área, de todos os picos.

Calcular a porcentagem de outros compostos relacionados à insulina na parcela de insulina utilizada, segundo a expressão:

$$100 \times (\%I + \%D)$$

No máximo 10,0% de insulina desamido A-21 são encontrados e no máximo 5,0% de outros compostos relacionados com insulina são encontrados. Para insulina derivada de uma única espécie, medir as respostas de quaisquer picos correspondentes à insulina bovina ou suína, e calcular respectivas concentrações como porcentagem de r_S . A quantidade de contaminação cruzada é de, no máximo, 1,0%.

Limite de proteínas de alto peso molecular. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 276 nm; coluna de 300 mm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada grupo diidroxipropano (5 μ m a 10 μ m) fluxo da *Fase móvel* de 0,5 mL/minuto.

Solução de arginina: preparar uma solução de L-arginina em água contendo 1 mg/mL.

Fase móvel: preparar uma mistura filtrada e desgaseificada de *Solução de arginina*, acetonitrila e ácido acético glacial (65:20:15). Fazer ajustes, se necessário.

Solução amostra: transferir cerca de 4 mg de insulina para um pequeno frasco, adicionar 1 mL de ácido clorídrico 0,01 M e misturar até dissolver. Armazenar essa solução em um refrigerador e utilizar em sete dias.

Solução de resolução: dissolver 4 mg de insulina contendo mais de 0,4% de proteínas de alto peso molecular em 1 mL de ácido clorídrico 0,01 M. Armazenar essa solução em um refrigerador e utilizar em sete dias.

Nota: insulina contendo a porcentagem indicada de proteínas de alto peso molecular pode ser preparada deixando a insulina em temperatura ambiente durante 5 dias.

Fazer a cromatografia da *Solução de resolução* injetando 100 µL e registrar as respostas de pico conforme indicado para em *Procedimento*. Os tempos de retenção estão entre 13 e 17 minutos para os complexos poliméricos de insulina, cerca de 17,5 minutos para o dímero covalente de insulina e entre 18 e 22 minutos para o monômero de insulina, com saís eluindo após o monômero de insulina. A razão da altura do pico do dímero covalente de insulina para a altura do vale entre o pico do dímero covalente de insulina e o pico do monômero de insulina não é menor que 2,0.

Procedimento: injetar 100 µL da *Solução amostra*, registrar o cromatograma e medir as áreas de respostas de pico, sem considerar quaisquer picos que tenham tempos de retenção maiores que aquele do monômero de insulina. Calcular a porcentagem de proteínas de alto peso molecular na parcela da insulina utilizada segundo a expressão:

$$\frac{100 \sum r_H}{(\sum r_H + r_M)}$$

em que,

$\sum r_H$ = somatória das respostas para todos os picos que tenham tempos de retenção menor que o do monômero de insulina;

r_M = resposta de pico do monômero de insulina (no máximo 1,0% é encontrado).

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos (5.5.3.1.2). A contagem bacteriana total é de, no máximo, 300 UFC/g, sendo o teste realizado em uma parcela de, , cerca de 0,2 g da amostra, pesada com exatidão.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo 10 UE/mg.

DOSEAMENTO

Método físico-químico

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 214 nm; coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada grupo octadecilsilano (1,5 µm a 10 µm), mantida a temperatura de 40 °C; fluxo da *Fase móvel* de 1,0 mL/minuto.

Tampão sulfato de sódio: dissolver 28,4 g de sulfato de sódio anidro em 1000 mL de água, adicionar 2,7 mL de ácido fosfórico e ajustar o pH para 2,3 utilizando etanolamina, se necessário.

Fase móvel: preparar uma mistura filtrada e degaseificada de *Tampão sulfato de sódio* com acetonitrila (74:26). A acetonitrila é aquecida a uma temperatura igual ou superior a 20 °C para evitar precipitação. Fazer ajustes, se necessário.

Preparação padrão: dissolver uma quantidade, pesada com exatidão, de insulina adequada SQR em ácido clorídrico 0,01 M para obter uma solução com uma concentração conhecida de cerca de 1,5 mg/mL.

Preparação de identificação: preparar uma solução de insulina suína SQR e insulina bovina SQR em ácido clorídrico 0,01 M, contendo cerca de 0,6 mg de cada por mL.

Preparação do ensaio: transferir cerca de 15 mg de insulina, pesada com exatidão, para um balão volumétrico de 10 mL, dissolver e diluir com ácido clorídrico 0,01 M para obter uma solução contendo uma concentração de cerca de 1,5 mg/mL.

Solução de adequação do sistema: dissolver cerca de 1,5 mg de insulina em 1 mL de ácido clorídrico 0,01 M. Deixar em temperatura ambiente por não menos que três dias para obter uma solução contendo, no mínimo, 5% de insulina desamido A-21.

Nota: a *Preparação de identificação*, a *Preparação padrão* e a *Preparação do ensaio* podem ser armazenadas em temperatura ambiente por até 12 horas ou em refrigeração por até 48 horas.

Fazer a cromatografia da *Preparação padrão* injetando 20 µL e registrar as respostas de pico conforme indicado em *Procedimento*. O desvio padrão relativo para as replicatas de injeções é, no máximo, 1,6%. Fazer a cromatografia injetando 20 µL da *Solução de adequação do sistema* e registrar as respostas de pico conforme indicado em *Procedimento*. A resolução, *R*, entre insulina e insulina desamido A-21 é, no mínimo, 2,0. O fator de cauda para o pico de insulina é, no máximo, 1,8.

Procedimento: injetar, separadamente, volumes iguais (cerca 20 µL) da *Preparação do ensaio*, da *Preparação de identificação* e da *Preparação padrão*, registrar os cromatogramas e medir as respostas de pico para insulina e insulina desamido A-21, utilizando o cromatograma da *Preparação de identificação* para identificar os picos de insulina. Para insulina derivada de uma única espécie, calcular a quantidade em base não seca, em unidades de insulina por mg, de insulina na *Preparação do ensaio* segundo a expressão:

$$\left(\frac{CS}{CU} \right) \left(\frac{\sum rU}{\sum rS} \right)$$

em que,

CS = concentração de insulina SQR na *Preparação padrão* (unidades de insulina/mL);

CU = concentração de insulina na *Preparação de ensaio* (mg/mL);

$\sum rU$ e $\sum rS$ = somatório das áreas dos picos de insulina e insulina desamido A-21 obtidas, respectivamente, dos cromatogramas da *Preparação de ensaio* e da *Preparação padrão*.

Do valor obtido no teste *Perda por dessecação*, calcular a quantidade em base seca. Para insulina derivada da mistura de bovina com suína, calcular a quantidade total como o somatório das quantidades das insulinas determinadas, separadamente.

Método biológico

Ensaio de insulina

A manifestação mais proeminente da atividade da insulina, uma diminuição abrupta da glicose sanguínea, foi a base para ensaios biológicos do tempo da primeira utilização clínica. O procedimento, ainda que relativamente trabalhoso, tem o grande mérito de refletir o efeito em um paciente diabético. O advento de métodos físico-químicos sofisticados e ainda práticos (por exemplo, cromatografia a líquido de alta eficiência) para medir, quantitativamente, a potência da insulina resultou em um teste resumido mais exato e preciso para insulina e produtos relacionados. Contudo, a bioidentidade da

insulina e de seus produtos não pode ser acessada por esses métodos. Assim, um teste quantitativo em coelhos está incluído nessa monografia e sua utilização é solicitada em monografias apropriadas.

O *Método quantitativo de glicemia de coelhos* é utilizado para determinar a potência dos padrões de referência de insulina, para a validação da estabilidade das novas preparações de insulina e para determinar as atividades específicas dos análogos de insulina.

Método quantitativo de glicemia de coelhos

Padrões de referência: glicose SQR, insulina SQR, insulina bovina SQR, insulina humana SQR, insulina suína SQR.

Diluyente: preparar uma solução aquosa contendo 0,1% a 0,25% (p/v) de cresol ou fenol, 1,4% a 1,8% (p/v) de glicerina e ácido clorídrico suficiente para produzir um pH entre 2,5 e 3,5, a menos que indicado de outra forma em uma monografia individual.

Solução estoque padrão: dissolver uma quantidade adequada e pesada com exatidão de insulina (*Padrão de referência*) ou um frasco de insulina (*Padrão de referência*) liofilizada de espécies apropriadas no *Diluyente* para fazer a *Solução estoque padrão* contendo 40 unidades de insulina por mL e possuindo um pH entre 2,5 e 3,5, a não ser que indicado de outra maneira em monografia individual. Armazenar em local fresco, protegida de congelamento; deve ser utilizada em seis meses.

Soluções padrão: diluir parcelas de *Solução estoque padrão* com *Diluyente* para obter duas soluções, uma contendo uma unidade de insulina por mL (*Solução padrão 1*) e a outra contendo duas unidades de insulina por mL (*Solução padrão 2*).

Solução estoque do ensaio: proceder como indicado para *Solução estoque padrão*, exceto para utilização de quantidade adequada da preparação em análise no lugar da insulina SQR. A *Solução estoque do ensaio* contém cerca de quarenta unidades de insulina por mL.

Soluções de ensaio: diluir parcelas da *Solução estoque do ensaio* com *Diluyente* para obter duas diluições da preparação do teste, uma das quais se espera que contenha uma unidade de insulina por mL (*Solução de ensaio 1*), baseando-se na suposta potência, e a outra que contenha duas unidades de insulina por mL (*Solução de ensaio 2*). No caso de uma injeção de insulina neutra, ajustar para um pH de 2,5 a 3,5, antes de realizar as diluições.

Doses das soluções a serem injetadas: selecionar, baseando-se em testes ou experiências anteriores, a dose das diluições a serem injetadas, cujo volume geralmente estará entre 0,30 mL e 0,50 mL. Para cada animal, o volume da *Solução padrão* é o mesmo que o da *Solução de ensaio*.

Preparação do animal: selecionar coelhos adequados e saudáveis, cada um pesando, no mínimo, 1,8 kg. Manter os coelhos no laboratório por não menos que uma semana antes da utilização no ensaio, mantendo-os em uma alimentação uniforme adequada, com água disponível em todos os momentos.

Procedimento: separar os coelhos em quatro grupos iguais, preferencialmente não menores que seis coelhos cada. No dia anterior, cerca de 20 horas antes do ensaio, fornecer a cada coelho uma quantidade de alimentos a ser consumida no prazo de seis horas. Seguir o mesmo esquema de alimentação antes de cada dia de teste. Durante o ensaio, retirar todos os alimentos até depois da amostra de sangue final ser coletada. Manipular os coelhos com cuidado para evitar a excitação excessiva e injetar, por via subcutânea, as doses indicadas na **Tabela 1**. A segunda injeção deve ser feita no dia seguinte à primeira injeção ou, no máximo, uma semana depois. O tempo entre a primeira e a segunda injeção é o mesmo para todos os coelhos.

Tabela 1 – Doses a serem injetadas nos coelhos por via subcutânea de acordo com o Método quantitativo de glicemia de coelhos.

<i>Grupo</i>	<i>Primeira injeção</i>	<i>Segunda injeção</i>
1	<i>Solução padrão 2</i>	<i>Solução de ensaio 1</i>
2	<i>Solução padrão 1</i>	<i>Solução de ensaio 2</i>
3	<i>Solução de ensaio 2</i>	<i>Solução padrão 1</i>
4	<i>Solução de ensaio 1</i>	<i>Solução padrão 2</i>

Amostras de sangue: uma hora \pm cinco minutos e duas horas e meia \pm cinco minutos após a injeção, coletar de cada coelho uma amostra adequada de sangue de uma veia marginal da orelha. O sangue também pode ser colhido de forma eficaz a partir da artéria central auricular.

Determinação do teor de glicose: determinar o teor de glicose das amostras de sangue por meio de um procedimento adequado que seja adaptado à análise automatizada. O procedimento a seguir pode ser usado.

Solução anticoagulante: dissolver 1 g de edetato dissódico e 200 mg de fluoreto de sódio em 1000 mL de água e misturar.

Preparações padrão de glicose: transferir concentrações conhecidas de glicose SQR a recipientes adequados e diluir, quantitativamente e por etapas, com solução anticoagulante (1:9) para obter uma série de *Preparações padrão de glicose* que contenham entre 20 e 100 mg por 100 mL, com concentrações conhecidas semelhantes às concentrações das amostras de sangue dos coelhos.

Preparações de teste: pipetar e transferir para recipientes separados e adequados 0,1 mL de cada amostra de sangue e 0,9 mL da *Solução anticoagulante*.

Procedimento: submeter as *Preparações de teste* à diálise através de uma membrana semipermeável por um tempo suficiente para que a glicose atravesse a membrana em uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) contendo glicose oxidase, peroxidase de rabanete (enzima peroxidase HPR), cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona SR e *N,N*-dimetilnilina. As absorvâncias das *Preparações de teste* são determinadas a 600 nm em um colorímetro. As absorvâncias das *Preparações padrão de glicose* são igualmente determinadas, no início e no final de cada execução.

Calcular a resposta de cada coelho para cada injeção, a partir da soma dos dois valores glicêmicos. Calcular as diferenças individuais, y , subtraindo as respostas conforme indicado na **Tabela 2**, não considerando a ordem cronológica.

Quando os dados para um ou mais coelhos estão faltando em um ensaio, não usar o intervalo de confiança de fórmulas descritas na monografia, mas procurar ajuda estatística. Os dados podem, ainda, ser analisados com análise adequada da variância.

Quando o número de coelhos, f , utilizado no ensaio é o mesmo em cada grupo, determinar a soma de y para cada grupo e calcular $T_a = -T_1 + T_2 + T_3 - T_4$ e $T_b = T_1 + T_2 + T_3 + T_4$. O logaritmo da potência relativa das diluições teste é $M' = 0,301 T_a/T_b$. A potência da injeção em unidades por mg equivale a antilog ($\log R + M'$), em que $R = V_s/V_u$, V_s é o número de unidades por mL de *Solução padrão* e V_u é o número de mg de insulina por mL da *Solução de ensaio* correspondente.

Determinar o intervalo de confiança de 95% para o log-potência relativa utilizando o Teorema de Fieller (veja o apêndice no final da monografia e *Procedimentos estatísticos aplicáveis aos ensaios*

biológicos descritos no capítulo 8.). Se o intervalo de confiança é maior do que 0,082, o que corresponde a $P = 0,95$, para limites de confiança de cerca de $\pm 10,0\%$ da potência computada, repetir o teste até que os dados combinados de dois ou mais ensaios, redeterminados como descrito em *Procedimentos estatísticos aplicáveis aos ensaios biológicos*, cumprirem esse limite aceitável.

Tabela 2 – Registro dos cálculos das respostas dos coelhos no Método quantitativo de glicemia de coelhos.

<i>Grupo</i>	<i>Diferenças</i>	<i>Resposta individual (y)</i>	<i>Resposta total (T)</i>	<i>Desvios padrão das diferenças (S)</i>
1	<i>Solução padrão 2 – Solução de ensaio 1</i>	y_1	T_1	S_1
2	<i>Solução de ensaio 2 – Solução padrão 1</i>	y_2	T_2	S_2
3	<i>Solução de ensaio 2 – Solução padrão 1</i>	y_3	T_3	S_3
4	<i>Solução padrão 2 – Solução de ensaio 1</i>	y_4	T_4	S_4

Bioidentidade

Cumprir as exigências do teste de bioidentidade sob ensaios de insulina. Proceder como indicado pelo *Método quantitativo de glicemia de coelhos* com as alterações a seguir.

Procedimento: separar os coelhos em quatro grupos iguais de dois coelhos cada.

Proceder com os cálculos conforme indicado no *Método quantitativo de glicemia de coelhos*, mas sem necessidade de determinar o intervalo de confiança do log-potência relativa, M' .

Se o valor da potência obtido é, no mínimo, 15 unidades/mg, a exigência do teste de bioidentidade está atendida. Se o valor da potência é inferior a 15 unidades/mg, repetir o teste utilizando mais oito coelhos. Se a potência média dos dois conjuntos de testes for, no mínimo, 15 unidades por mg, a exigência do teste foi atendida.

Apêndice - Teorema de Fieller para determinação do intervalo de confiança para uma razão

Essa versão do Teorema de Fieller aplica-se ao caso em que o numerador e o denominador não são correlacionados. No uso dessa equação assume-se que o numerador e o denominador são normalmente distribuídos e os grupos de coelhos são de tamanho igual.

Logo, o intervalo de confiança de 95% para a relação é:

$$(L,U) = \frac{M' \pm \frac{t}{T_b} \sqrt{(1-g)S_N^2 + (M')^2 S_D^2}}{1-g}$$

em que f (graus de liberdade do erro padrão) = $4(k - 1)$, k é a quantidade de coelhos em um grupo, t é o percentil 97,5 superior da distribuição t com graus f de liberdade, e:

$$g = \frac{t^2 S_D^2}{T_b^2}$$

Se $g \geq 1$, o denominador não é significativamente diferente de 0 e a fórmula não funciona.

$$S_N = 0,301\sqrt{k}\sqrt{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + S_4^2}$$

$$S_D = \sqrt{k}\sqrt{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + S_4^2}$$

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Observar a legislação vigente.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA HUMANA

$C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$; 5807,58
insulina humana; 04918
[11061-68-0]

Insulina humana é uma proteína correspondente a um princípio ativo elaborada no pâncreas humano que afeta o metabolismo dos carboidratos (particularmente glicose), lípidos e proteínas. É derivada por modificação enzimática da insulina do pâncreas suíno de modo a alterar a sequência de aminoácidos apropriadamente ou produzida por síntese microbiana via processo de DNA recombinante. A quantidade, calculada na base seca, é, no mínimo, 27,5 unidades de insulina humana em cada miligrama. O teor de pró-insulina de insulina humana derivada de suínos é no máximo de 10 ppm. O teor de proteínas advindas de célula hospedeira de insulina humana derivada de um processo de DNA recombinante, determinado por um método apropriado e validado, é no máximo de 10 ppm. O teor de DNA derivado da célula hospedeira ou do vetor e o limite de insulina humana derivada de um processo de DNA recombinante que utiliza células eucariontes são determinados por um método validado.

Nota: uma unidade de insulina humana equivale a 0,0347 mg de insulina humana pura.

IDENTIFICAÇÃO

A. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Preparação do ensaio*, obtido em *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Preparação padrão*.

B. Determinar os fragmentos peptídicos, utilizando o seguinte procedimento de mapeamento de peptídeos. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 214 nm; coluna de 100 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (1,5 a 10 µm), mantida à temperatura de 40 °C; fluxo da *Fase móvel* de 1,0 mL/minuto.

Tampão sulfato: misturar volumes iguais de sulfato de amônio 2 M e ácido sulfúrico 0,5 M e filtrar.

Solução enzimática: preparar uma solução de protease *Staphylococcus aureus* V-8 em água, contendo uma atividade de 500 unidades por mililitro.

Tampão HEPES: dissolver 2,38 g de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico) em cerca de 90 mL de água em um balão volumétrico de 100 mL. Ajustar o pH para 7,5 utilizando hidróxido de sódio 5 M. Diluir com água até completar o volume do balão e misturar.

Eluente A: preparar uma mistura filtrada e degaseificada de 100 mL de acetonitrila, 700 mL de água e 200 mL de *Tampão sulfato*.

Eluente B: preparar uma mistura filtrada e degaseificada de 400 mL de acetonitrila, 400 mL de água e 200 mL de *Tampão sulfato*.

Solução padrão de digestão: dissolver cerca de 6 mg de insulina humana SQR em 3 mL de ácido clorídrico 0,01 M e transferir 500 µL da solução resultante para um frasco limpo. Adicionar 2 mL de *Tampão HEPES* e 400 µL de *Solução enzimática* e incubar a 25 °C durante seis horas. Interromper a digestão pela adição de 2,9 mL de *Tampão sulfato*.

Solução teste de digestão: para 1 mg de insulina humana, adicionar 500 µL de ácido clorídrico 0,01 M e misturar para dissolver. Proceder conforme indicado para *Solução padrão de digestão*, iniciando por “adicionar 2 mL de *Tampão HEPES*”.

Gradiente da Fase móvel: adotar o sistema de gradiente descrito na tabela a seguir.

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Eluente A (%)</i>	<i>Eluente B (%)</i>	<i>Eluição</i>
0	90	10	equilíbrio
0 – 60	90 → 30	10 → 70	gradiente linear
60 – 65	30 → 0	70 → 100	gradiente linear
65 – 70	0	100	isocrática
70 – 71	0 → 90	100 → 10	gradiente linear
71 – 86	90	10	reequilíbrio

Procedimento: injetar, separadamente, volumes iguais de *Solução padrão de digestão* e *Solução teste de digestão*, registrar os cromatogramas e medir a área sob os picos. O perfil cromatográfico da *Solução teste de digestão* corresponde àquele da *Solução padrão de digestão*. Realizar ensaio em branco e fazer as correções necessárias. O fator de cauda é, no máximo, 1,5. A resolução entre os picos do fragmento de digestão II e do fragmento de digestão III é, no mínimo, 3,4.

Nota: fragmento I elui ao mesmo tempo na insulina derivada de suínos e insulina humana; fragmento II elui ao mesmo tempo em todas as insulinas; e fragmento III elui ao mesmo tempo na insulina derivada de bovinos e suínos.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Perda por dessecação (5.2.9.1). Pesas, com exatidão, cerca de 200 mg e secar a 105 °C por 16 horas. No máximo 10,0%.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.11.3)*. Determinar o teor de zinco em, exatamente, cerca de 10 mg da amostra. No máximo 1,0% para insulina humana anidra.

ENSAIOS DE PUREZA

Substâncias relacionadas. Proceder conforme descrito em *Substâncias relacionadas* na monografia de *Insulina*, com exceção para a utilização do seguinte *Gradiente da Fase Móvel*: o programa requer inicialmente eluição isocrática, por cerca de 36 minutos com a *Fase móvel* consistindo de uma mistura de 78% de *Eluente A* e 22% de *Eluente B*, seguida da eluição por gradiente linear. Posteriormente, o sistema retorna para as condições iniciais de 78% de *Eluente A* e 22% de *Eluente B*. Ajustar a composição da *Fase móvel* de modo que o tempo de retenção do pico principal de insulina humana seja entre 15 e 25 minutos. O teor de insulina desamido A-21 e de outros compostos relacionados à insulina é no máximo 2% para cada uma das quantidades totais de insulina e de compostos relacionados.

Limite de proteínas de alto peso molecular. Proceder conforme descrito em *Limite de proteínas de alto peso molecular* na monografia de *Insulina*. No máximo 1,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos (5.5.3.1.2). No máximo 300 UFC/g, sendo o teste feito em cerca de 0,2 g da amostra, pesada com exatidão.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo, 10 UE/mg de insulina humana.

DOSEAMENTO

Método físico-químico

Proceder conforme descrito em *Doseamento* da monografia de *Insulina*. Utilizar a mesma *Fase móvel*, *Preparação padrão*, *Preparação de ensaio*, *Solução de resolução*, o sistema cromatográfico e o *Procedimento* descritos na monografia de *Insulina*, com exceção para utilizar insulina humana SQR e qualquer outro substituto de insulina humana para insulina do começo ao fim.

*Fragmento I consiste de aminoácidos A5 a A17 e B1 a B13; fragmento II consiste de aminoácidos A18 a A21 e B14 a B21; fragmento III consiste de aminoácidos B22 a B30; fragmento IV consiste de aminoácidos A1 a A4. A refere-se à cadeia-A da insulina humana e B refere-se à cadeia B da insulina humana.

Bioidentidade

Cumpra o teste de *Bioidentidade* da monografia de *Insulina*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Observar a legislação vigente.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA HUMANA INJETÁVEL

Insulina humana injetável é uma solução isotônica e estéril de insulina humana. Contém, no mínimo, 95,0% e, no máximo, 105,0% da quantidade rotulada, expressa em unidades de insulina em cada mL.

IDENTIFICAÇÃO

O tempo de retenção do pico principal no cromatograma da *Preparação de ensaio*, obtido em *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal no cromatograma da *Preparação padrão*.

Nota: pode ser necessário injetar a mistura da *Preparação de ensaio* e *Preparação de identificação*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.11.3)* ou *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Entre 10 µg e 40 µg para cada 100 UI de insulina para espécies apropriadas.

ENSAIOS DE PUREZA

Contaminação por partículas (5.1.7). Cumpre as exigências para injeções de pequeno volume para ambos os métodos.

pH (5.2.19). 7,0 a 7,8. Determinar potenciométricamente.

Limite de proteínas de alto peso molecular. Preparar a *Solução de arginina, Fase móvel, Solução de adequação de sistema* e o sistema cromatográfico conforme descrito em *Limite de proteínas de alto peso molecular* na monografia de *Insulina* e utilizar o mesmo *Procedimento*. Preparar a *Solução teste* como descrito a seguir. No máximo 2%.

Solução de teste: quantitativamente adicionar 4 µL de ácido clorídrico 6 M por mililitro de um volume de injeção medido com exatidão e misturar.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). Contém, no máximo, 80 UE/100 UI de insulina.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Preparar a *Fase móvel, Preparação de identificação, Preparação padrão, Solução de adequação do sistema* e sistema cromatográfico conforme descrito em *Doseamento* da monografia de *Insulina*. Preparar a *Preparação de ensaio* conforme descrito em *Doseamento* da monografia de *Insulina Injetável*.

Procedimento: injetar, separadamente, volumes iguais (cerca de 20 µL) da *Preparação de ensaio*, da *Preparação de identificação*, e da *Preparação padrão* no cromatógrafo, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos da insulina e insulina desamido A-21, utilizando o cromatograma da *Preparação de identificação* para identificar os picos de insulina. Para injeção de insulina preparada de uma única espécie, calcular a quantidade, em unidades de insulina por mL, da injeção tomada, segundo a expressão:

$$C \times D \times \left(\frac{\sum rU}{\sum rS} \right)$$

em que,

C = concentração, em unidades de insulina por mL, de insulina SQR na *Preparação padrão*;

D = fator de diluição;

$\sum rU$ e $\sum rS$ = somatório das áreas sob os picos de insulina e insulina desamido A-21 obtidas respectivamente dos cromatogramas da *Preparação de ensaio* e da *Preparação padrão*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes fechados, protegidos da luz e em refrigerador. Evitar o congelamento.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA HUMANA ISOFANA SUSPENSÃO

Insulina humana isofana suspensão é uma suspensão estéril de cristais de insulina humana zinco combinada com sulfato protamina em água tamponada para a injeção, combinados de uma maneira tal que a fase sólida da suspensão é composta por cristais de insulina humana, protamina e zinco. O sulfato de protamina é preparado a partir do esperma ou a partir dos testículos em maturação de peixes pertencentes ao gênero *Oncorhynchus* Suckley ou *Salmo* Linné (família Salmonidae). Contém, calculado com base na soma de seus componentes de insulina e insulina desamido, no mínimo, 95,0% e, no máximo, 105,0% da quantidade declarada no rótulo, expressa em unidades de insulina humana em cada mililitro.

IDENTIFICAÇÃO

Centrifugar 10 mL da suspensão a 1500 g por 10 minutos. Determinar o teor de insulina no sobrenadante conforme descrito em *Doseamento* na monografia de *Insulina*. A concentração de insulina é, no máximo, 1,0 UI/mL.

CARACTERÍSTICAS

Proceder conforme descrito em *Características* na monografia de *Insulina*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco (5.3.3.11.3). Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.11.3)* ou *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Entre 21 µg e 40 µg para cada 100 UI de insulina humana.

Zinco em solução. Centrifugar uma porção de suspensão suficiente para o teste e determinar o teor de zinco no sobrenadante límpido. Entre 20% e 65% do teor de zinco total.

ENSAIOS DE PUREZA

pH (5.2.19). Entre 7,0 e 7,5.

Limite de proteínas de alto peso molecular. Proceder conforme descrito em *Limite de proteínas de alto peso molecular* na monografia de *Insulina injetável*. No máximo 3,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpra as exigências, quando testado como indicado para *Filtração por membranas* em *Teste de esterilidade do produto a ser examinado*, e a suspensão a ser filtrada imediatamente depois de ter sido reduzido a uma solução clara pela adição de um recém preparado 1 em 100 solução de ácido ascórbico em *Fluido A*.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). Contém, no máximo, 80 UE/100 UI de insulina humana.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Doseamento* na monografia de *Insulina*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Observar a legislação vigente.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA HUMANA ISOFANA SUSPENSÃO E INSULINA HUMANA INJETÁVEL

Insulina humana isofana suspensão e insulina humana injetável é uma suspensão estéril tamponada de insulina humana, complexada com sulfato de protamina, em uma solução de insulina humana.

IDENTIFICAÇÃO

O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Preparação do ensaio*, obtido em *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Preparação padrão*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.11.3)* ou *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Entre 0,02 mg e 0,04 mg para cada 100 UI de insulina humana.

ENSAIOS DE PUREZA

pH (5.2.19). Entre 7,0 e 7,8, determinado potenciometricamente.

Limite de proteínas de alto peso molecular. Preparar a *Solução de arginina, Fase móvel, Solução de adequação de sistema* e o sistema cromatográfico conforme descrito em *Limite de proteínas de alto peso molecular* na monografia de *Insulina* e utilizar o mesmo *Procedimento*. Preparar a *Solução teste* como descrito a seguir. No máximo 3,0%.

Solução teste: quantitativamente adicionar 4 µL de ácido clorídrico 6 M por mililitro de um volume de injeção medido com exatidão e misturar.

Conteúdo de insulina humana solúvel.

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Preparar a *Fase móvel, a Solução de adequação de sistema* e o sistema cromatográfico conforme descrito em *Doseamento* na monografia de *Insulina*. Preparar as soluções descritas a seguir.

Solução teste de insulina solúvel: manter a temperatura entre 24 °C e 26 °C durante todo o procedimento. Transferir 5 mL da insulina humana injetável para um tubo de centrifuga. Adicionar 20 µL de hidróxido de sódio M e ajustar com ácido clorídrico 0,05 M ou hidróxido de sódio 0,05 M para um pH entre 8,18 e 8,22 se a concentração total de zinco for aproximadamente 20 µg/mL, ou ajustar para um pH entre 8,33 e 8,37 se a concentração total de zinco for 30 µg/mL. Registrar o volume, em µL, de ácido ou base requerido para ajustar o pH. Misturar e deixar em repouso durante uma hora. Centrifugar, transferir o sobrenadante para outro tubo de centrifuga e repetir a centrifugação. Transferir 2 mL do sobrenadante para outro tubo, adicionar 5 µL de ácido clorídrico 9,6 M e misturar.

Solução teste de insulina total: transferir 2 mL da insulina humana injetável para recipiente apropriado, adicionar 5 µL de ácido clorídrico 9,6 M e deixar a suspensão clarificar. Diluir a solução resultante com ácido clorídrico 0,01 M para a mesma concentração teórica de insulina da *Solução teste de insulina solúvel* (por exemplo, se a insulina humana injetável for rotulada por conter 20% de insulina solúvel, o fator de diluição é $100/20 = 5$).

Procedimento: injetar, separadamente, volumes iguais (cerca de 20 µL) da *Solução teste de insulina solúvel* e da *Solução teste de insulina total* no cromatógrafo, registrar os cromatogramas. Medir as respostas de pico para insulina e insulina desamido A-21. Calcular a quantidade de insulina humana solúvel como uma porcentagem de teor de insulina total da insulina humana injetável segundo a expressão:

$$\left(\frac{100}{D}\right) \times \left[\frac{(5020 + VA)}{5000}\right] \times \left(\frac{rS}{rT}\right)$$

em que,

D = fator de diluição para a *Solução teste de insulina total*;

VA = número de µL adicionado para ajustar o pH da *Solução teste de insulina solúvel*;

rS e rT = respostas respectivamente da *Solução teste de insulina solúvel* e a *Solução teste de insulina total*.

A porcentagem de insulina humana solúvel está no intervalo ($L \pm 5$), no qual L é a porcentagem de insulina humana solúvel especificada no rótulo do produto.

B. Preparar a *Fase móvel*, a *Solução de adequação de sistema* e o sistema cromatográfico conforme descrito em *Doseamento* da monografia de *Insulina*.

Preparar as soluções descritas a seguir.

Tampão Tris 0,1 M: dissolver ($3,54 \pm 0,01$) g de cloridrato de trometamina e ($3,34 \pm 0,01$) g de trometamina em 500 mL de água. O pH do *Tampão Tris 0,1 M* deve estar entre 8,15 e 8,35.

Solução teste de insulina solúvel: diluir um volume adequado da insulina humana injetável em *Tampão Tris 0,1 M* para obter uma solução contendo cerca de 6 unidades de insulina humana solúvel por mililitros de insulina (por exemplo, 2 mL de 70/30 suspensão de insulina humana isofana e insulina humana injetável contendo 100 unidades de insulina humana por mililitro seria diluída com 8 mL de *Tampão Tris 0,1 M* para obter um filtrado que contenha 6 unidades de insulina humana de insulina solúvel por mililitro). Imergir o recipiente em banho-maria a (25 ± 1) °C durante (30 ± 2) minutos. Imediatamente, passar essa solução por um filtro de diâmetro de poro de 0,2 µm utilizando seringa descartável. Transferir duas partes do filtrado para um recipiente adequado, adicionar uma parte de ácido clorídrico 0,2 M (por exemplo, o fator de diluição para a *Solução teste de insulina solúvel* que contenha 30% de insulina solúvel é $5 \times 3/2 = 7,5$).

Solução teste de insulina total: para cada mililitro da insulina humana injetável, adicionar 3 µL de ácido clorídrico 9,6 M, misturar e deixar a suspensão clarificar. Diluir a solução resultante com ácido clorídrico 0,01 M para quatro unidades de insulina humana por mililitro (por exemplo, se o produto está rotulado como contendo um total de 100 unidades de insulina humana por mililitro, o fator de diluição é 25). Calcular a quantidade de insulina humana solúvel como uma porcentagem de teor de insulina total da insulina humana injetável segundo a expressão:

$$\left(\frac{100DS}{DT}\right) \times \left(\frac{rS}{rT}\right)$$

em que,

DS e DT = fatores de diluição para *Solução teste de insulina solúvel* e *Solução teste de insulina total*, respectivamente;

rS e rT = respostas de pico obtidas respectivamente da *Solução teste de insulina solúvel* e da *Solução teste de insulina total*.

A porcentagem de insulina humana solúvel está no intervalo ($L \pm 5$), no qual L é a porcentagem de insulina humana solúvel especificada no rótulo do produto.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo, 80 UE/100 UI de insulina humana.

DOSEAMENTO

A determinação da quantidade é baseada na somatória da própria insulina e componentes da insulina desamido, conforme determinada em *Doseamento* na monografia de *Insulina Humana Injetável*. No mínimo, 95,0% e, no máximo, 105,0% da quantidade especificada no rótulo, expressa em unidades de insulina humana em cada mL.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Manter em recipiente fechado de dose múltipla, fornecido pelo fabricante. Conservar em refrigerador, ao abrigo da luz solar e evitar o congelamento.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA HUMANA ZINCO SUSPENSÃO

Insulina humana zinco suspensão é uma suspensão estéril de insulina humana em água tamponada para a injeção, modificada pela adição de um sal de zinco adequado de modo que a fase sólida da suspensão é constituída por uma mistura de insulina cristalina e amorfa em uma razão de cerca de sete partes de cristais e de três partes de material amorfo. Contém, calculado com base na soma dos seus componentes de insulina e insulina desamido, no mínimo, 95,0% e, no máximo, 105,0% da quantidade declarada no rótulo, expressa em unidade de insulina humana por mililitro.

IDENTIFICAÇÃO

A. A insulina no sobrenadante cumpre o teste de *Identificação* da monografia *Insulina humana isofana suspensão*.

B. Centrifugar uma quantidade de suspensão representando 1000 unidades de insulina e descartar o sobrenadante. Suspender o resíduo em 8,4 mL de água, rapidamente acrescentar 16,6 mL de acetona tamponada SR, agitar vigorosamente e centrifugar dentro de três minutos após a adição da acetona tamponada. Desprezar o sobrenadante, repetir o tratamento com água e acetona tamponada SR, centrifugar e descartar o sobrenadante. Dissolver o resíduo cristalino em 5 mL de ácido clorídrico diluído (1 em 100). A insulina não extraída por acetona tamponada SR, determinada por um método adequado, está entre 63% e 77% do teor total de insulina de uma quantidade igual de suspensão.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Entre 7,0 e 7,8. Determinar potenciometricamente.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.11.3)* ou *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. A quantidade de zinco total é entre 0,12 mg e 0,25 mg para cada 100 UI de insulina.

Zinco em solução. Centrifugar uma porção de suspensão suficiente para o teste e determinar o teor de zinco no sobrenadante límpido. Entre 20% e 65% do teor de zinco total.

ENSAIO DE PUREZA

Limite de proteínas de alto peso molecular. Proceder conforme descrito em *Limite de proteínas de alto peso molecular* na monografia de *Insulina injetável*. No máximo 1,5%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo 80 UE/100 UI de insulina humana.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Doseamento* na monografia de *Insulina*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Manter em recipiente fechado de dose múltipla, fornecido pelo fabricante. Conservar em refrigerador, ao abrigo da luz solar e evitar o congelamento.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA HUMANA ZINCO SUSPENSÃO ESTENDIDA

Insulina humana zinco suspensão estendida é uma suspensão estéril de insulina humana em água tamponada para a injeção, modificada pela adição de um sal de zinco adequado de modo que a fase sólida da suspensão é predominantemente cristalina. Contém, calculado com base na soma dos seus componentes de insulina e insulina desamido, no mínimo, 95,0% e, no máximo, 105,0% da quantidade declarada no rótulo, expressa em unidades de insulina humana por mililitro.

IDENTIFICAÇÃO

A. A insulina no sobrenadante cumpre o teste de *Identificação* da monografia *Insulina humana isofana suspensão*.

B. Proceder conforme descrito no teste **B.** de *Identificação* da monografia de *Insulina humana zinco suspensão*.

C. A concentração de insulina, determinada por um método descrito na monografia de *Insulina*, não é inferior a 90% do conteúdo total de insulina.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.11.3)* ou *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Entre 0,12 mg e 0,25 mg para cada 100 UI de insulina.

Zinco em solução. Centrifugar uma porção de suspensão suficiente para o teste e determinar o teor de zinco no sobrenadante límpido. Entre 20% e 65% do teor de zinco total.

ENSAIO DE PUREZA

pH (5.2.19). Entre 7,0 e 7,8.

Limite de proteínas de alto peso molecular. Proceder conforme descrito em *Limite de proteínas de alto peso molecular* na monografia de *Insulina injetável*. No máximo 1,5%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo 80 UE/100 UI de insulina humana.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Doseamento* na monografia de *Insulina injetável*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Observar a legislação vigente.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA INJETÁVEL

Insulina injetável é uma solução isotônica e estéril de insulina. Contém, no mínimo, 95,0% e, no máximo, 105,0% da quantidade declarada no rótulo, expressa em unidades de insulina.

IDENTIFICAÇÃO

O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Preparação de ensaio*, obtido em *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Preparação de identificação*

Nota: pode ser necessário injetar a mistura da *Preparação de ensaio* e *Preparação de identificação*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.11.3)* ou *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Entre 10 µg e 40 µg para cada 100 UI de insulina para espécies apropriadas.

ENSAIO DE PUREZA

Contaminação por partículas (5.1.7). Cumpre as exigências para injeções de pequeno volume. Aplicar ambos os métodos.

pH (5.2.19). 7,0 a 7,8. Determinar potenciométricamente.

Limite de proteínas de alto peso molecular. Preparar a *Solução de arginina, Fase móvel, Solução de adequação de sistema* e o sistema cromatográfico conforme descrito em *Limite de proteínas de alto peso molecular* na monografia de *Insulina* e utilizar o mesmo *Procedimento*. Preparar a *Solução teste* como descrito a seguir. No máximo 2%.

Solução teste: adicionar quantitativamente 4 µL de ácido clorídrico 6 M por mililitro de um volume de injeção medido com exatidão e homogeneizar.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo, 80 UE/100 UI de insulina.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Preparar a *Fase móvel, Preparação de identificação, Preparação padrão, Solução de adequação de sistema* e o sistema cromatográfico conforme descrito em *Doseamento* da monografia de *Insulina*.

Nota: a *Preparação de identificação, Preparação padrão e Preparação de ensaio* podem ser armazenadas em temperatura ambiente por até 12 horas ou em refrigeração por até 48 horas.

Preparação de ensaio 1: (para injeção rotulada como contendo 40 UI/mL) adicionar 2,5 µL de ácido clorídrico 9,6 M por mL de um volume medido com exatidão da injeção. Deixar a suspensão, se presente, clarificar e misturar.

Preparação de ensaio 2: (para injeção rotulada como contendo 100 UI/mL) adicionar 2,5 µL de ácido clorídrico 9,6 M por mL de um volume medido com exatidão da injeção. Deixar a suspensão, se presente, clarificar e homogeneizar. Pipetar 2 mL dessa solução e transferir para um balão volumétrico de 5 mL, completar o volume com ácido clorídrico 0,01 M e homogeneizar.

Nota: coleta de diversos pacotes de unidades pode ser necessária para obter volume suficiente do material de teste para a Preparação de ensaio 2.

Procedimento: injetar, separadamente, volumes iguais (cerca de 20 µL) da Preparação de ensaio, da Preparação de identificação e da Preparação padrão no cromatógrafo, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos da insulina e insulina desamido A-21, utilizando o cromatograma da Preparação de identificação para identificar os picos de insulina. Para injeção de insulina preparada de uma única espécie, calcular a quantidade, em unidades de insulina por mL, da injeção tomada segundo a expressão:

$$C \times D \times \left(\frac{\sum rU}{\sum rS} \right)$$

em que,

C = concentração, em unidades de insulina por mL, de insulina SQR na Preparação padrão;

D = fator de diluição;

$\sum rU$ e $\sum rS$ = somatório das áreas sob os picos de insulina e insulina desamido A-21 obtidas respectivamente dos cromatogramas da Preparação de ensaio e da Preparação padrão.

Nota: para insulina derivada da mistura de bovina e suína, calcular a quantidade total como o somatório das quantidades das insulinas derivadas de bovinos e suínos, determinadas como indicado acima.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Manter em recipiente fechado de dose múltipla, fornecido pelo fabricante. Conservar em refrigerador, ao abrigo da luz solar e evitar o congelamento.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

35 - 40	20 → 95	80 → 5	retorno ao inicial
40 - 50	95	5	reequilíbrio

CARACTERÍSTICAS

Perda por dessecação (5.2.9.1). Pesar, com exatidão, cerca de 300 mg da amostra e secar a 105 °C por 16 horas. No máximo, 10,0%.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.11.3)*. Determinar o teor de zinco em cerca de 20 mg da amostra. Entre 0,30% e 0,60%, em relação à base seca.

ENSAIOS DE PUREZA

Limite de proteínas de alto peso molecular. Proceder conforme descrito em *Limite de proteínas de alto peso molecular* da monografia *Insulina*. No máximo 0,25%.

Substâncias relacionadas. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 214 nm; coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (1,5 µm a 10 µm), mantida a temperatura de 40 °C; fluxo da *Fase móvel* de 1,0 mL/minuto.

Diluyente: proceder conforme descrito em *Doseamento*.

Eluente A: preparar uma mistura filtrada e desgaseificada de *Diluyente* e acetonitrila (82:18).

Eluente B: preparar uma mistura filtrada e desgaseificada de *Diluyente* e acetonitrila (50:50).

Gradiente da Fase móvel: adotar o sistema de gradiente descrito na tabela a seguir.

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Eluente A (%)</i>	<i>Eluente B (%)</i>	<i>Eluição</i>
0 - 3	95	5	isocrática
3 - 30	95 → 41	5 → 59	gradiente linear
30 - 35	41 → 20	59 → 80	gradiente linear
35 - 40	20 → 95	80 → 5	retorna ao estado inicial
40 - 50	95	5	reequilíbrio

Solução de adequação do sistema: dissolver quantidade, pesada com exatidão, da insulina lispro em ácido clorídrico 0,01 M para obter uma solução contendo cerca de 3,5 mg por mL. Deixar em repouso à temperatura ambiente para obter uma solução contendo entre 0,8% e 11% de insulina lispro desamido A-21.

Solução teste: dissolver cerca de 3,5 mg de insulina lispro em 1 mL de ácido clorídrico 0,01 M. Guardar a solução por, no máximo, 56 horas no refrigerador.

Procedimento: proceder conforme descrito no *Procedimento* do teste de *Substâncias relacionadas* da monografia *Insulina*. No máximo 1,0% da insulina lispro desamido A-21; no máximo 0,5% de qualquer outra substância relacionada à insulina lispro; no máximo 2,0% de impurezas totais, exceto insulina lispro desamido A-21.

Ajustar a composição da *Fase móvel* e a duração da eluição isocrática para obter um tempo de retenção de cerca de 41 minutos para a insulina lispro, com insulina lispro desamido A-21 eluindo perto do início da fase de gradiente linear. Injetar a *Solução de adequação do sistema* e registrar as respostas de pico conforme indicado no *Procedimento*. A resolução entre a insulina lispro e insulina lispro desamido A-21 é, no mínimo, 2,5; e o fator de cauda para o pico de insulina lispro é, no máximo, 2,0.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos (5.5.3.1.2). No máximo 100 UFC/g, sendo o teste feito em, exatamente, cerca de 0,3 g da amostra.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo 10 UE/mg, utilizar a técnica cromogênica descrita em *Técnicas fotométricas*.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 214 nm; coluna de 100 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (1,5 µm a 10 µm), mantida a temperatura de 40 °C; fluxo da *Fase móvel* de 0,8 mL/minuto.

Diluyente: dissolver 28,4 g de sulfato de sódio anidro em 1000 mL de água, misturar e ajustar com ácido fosfórico para um pH de 2,3.

Fase móvel: misturar 745 mL de *Diluyente* e 255 mL de acetonitrila. Fazer ajustes, se necessário, de acordo com *Adequabilidade do sistema* descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*.

Solução do sistema de adequação: dissolver uma quantidade, pesada com exatidão, da insulina lispro em ácido clorídrico 0,01 M para obter uma solução com uma concentração de cerca de 1,0 mg/mL. Deixar em repouso à temperatura ambiente para obter uma solução contendo entre 0,8% e 11% de insulina lispro desamido A-21.

Preparação padrão: dissolver uma quantidade, pesada com exatidão, da insulina lispro SQR em ácido clorídrico 0,01 M para obter uma solução com concentração de cerca de 0,7 mg/mL.

Preparação de ensaio: dissolver uma parcela, pesada com exatidão, da insulina lispro em ácido clorídrico 0,01 M para obter uma solução com concentração de cerca de 0,8 mg/mL.

Procedimento: injetar, separadamente, volumes iguais (cerca de 20 µL) da *Preparação padrão* e da *Preparação de ensaio*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos principais. Calcular a quantidade, na unidade de insulina lispro por miligrama, segundo a expressão:

$$\frac{CS}{CU} \times \left(\frac{rU}{rS} \right)$$

em que,

CS = concentração, em unidades de insulina lispro por mL, da insulina lispro SQR na *Preparação padrão*;

CU = concentração, em mg/mL, da insulina lispro na *Preparação de ensaio*;
rU e rS = áreas sob os picos da insulina lispro obtidas a partir da *Preparação de ensaio* e *Preparação padrão*, respectivamente. A partir do valor obtido no teste de *Perda por dessecação*, calcular a quantidade em relação à base seca.

Ajustar a composição da *Fase móvel* para fornecer um tempo de retenção de cerca de 24 minutos para o pico principal de insulina lispro. Injetar em triplicata a *Solução de adequação do sistema* e registrar as respostas de pico conforme indicado no *Procedimento*. A resolução entre a insulina lispro e a insulina lispro desamido A-21 é, no mínimo, 3; o fator de cauda para o pico de insulina lispro é, no máximo, 1,5; e o desvio padrão relativo para replicar as injeções é, no máximo, 1,1%.

Bioidentidade

Proceder conforme descrito no teste *Bioidentidade* em *Doseamento* da monografia *Insulina*. Realizar a coleta de sangue conforme descrito a seguir. Cumpre o teste.

Amostras de sangue: (45 ± 5) minutos e duas horas e (30 ± 5) minutos após a injeção, coletar de cada coelho uma amostra adequada de sangue de uma veia marginal da orelha. O sangue também pode ser colhido de forma eficaz a partir da artéria central auricular.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados, ao abrigo da luz e em refrigerador.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

NADROPARINA CÁLCICA

Nadroparinum calcicum

A nadroparina cálcica é uma preparação de heparina de baixo peso molecular que contém o sal cálcio. Essa heparina, de baixo peso molecular, é obtida por meio da despolimerização com ácido nitroso da heparina da mucosa intestinal suína, seguida de fracionamento para eliminar seletivamente a maior parte das cadeias com peso molecular inferior a 2000 Da. A maioria das cadeias possui um ácido 2-O-sulfo- α -L-idopiranosurônico na extremidade não redutora e uma estrutura de 6-O-sulfo-2,5-anidro-D-manitol na extremidade redutora da sua cadeia.

A nadroparina cálcica deve estar em conformidade com a monografia *Heparina baixa peso molecular* com as modificações e exigências adicionais descritas a seguir.

A massa molecular média relativa deve variar de 3600 Da a 5000 Da, com um valor característico de cerca de 4300 Da. O grau de sulfatação deve estar em torno de dois sulfatos por unidade dissacarídica. A potência deve ser, no mínimo, 95 UI e, no máximo, 130 UI de atividade antifator Xa por miligrama, calculada com referência à substância dessecada. A razão da atividade antifator Xa para atividade antifator IIa deve ser de 2,5 a 4,0.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia *Heparina de baixo peso molecular*. Calcular a potência em relação à atividade antifator Xa por miligrama e à atividade antifator IIa.

B. Proceder conforme descrito no teste **B.** de *Identificação* da monografia *Heparina de baixo peso molecular*. O espectro obtido deve ser similar ao da nadroparina padrão.

C. Proceder conforme descrito no teste **C.** de *Identificação* da monografia *Heparina de baixo peso molecular*. Os seguintes requisitos se aplicam: a massa molecular média relativa deve variar entre 3600 Da e 5000 Da; a porcentagem de cadeias com peso molecular inferior a 2000 Da deve ser, no mínimo, 15%; a porcentagem de cadeias com peso molecular entre 2000 Da e 8000 Da varia entre 75% e 95%; a porcentagem de cadeias com peso molecular entre 2000 Da e 4000 Da varia entre 35% e 55%.

ENSAIOS DE PUREZA

Álcool etílico. No máximo 1% (m/m). Proceder conforme descrito em *Cromatografia a gás em espaço confinado (headspace)* (5.2.17.5.1), utilizando 2-propanol SR como padrão interno. Utilizar cromatógrafo a gás provido de detector de ionização de chamas, utilizando coluna de níquel com 1,5 m de comprimento e 2 mm de diâmetro interno empacotada com copolímero etilvinilbenzeno e divinilbenzeno com espessura de filme de 150 μ m a 180 μ m; temperatura da coluna de 150 °C e temperatura da porta de injeção e do detector a 250 °C; utilizar gás hélio ou nitrogênio como gás de arraste; fluxo de 30 mL/minuto.

Solução de padrão interno: diluir 1 mL de 2-propanol SR em 100 mL de água purificada. Diluir 1 mL dessa solução em 50 mL de água purificada.

Solução de referência: diluir 1 mL de álcool etílico SR em 100 mL de água purificada. Diluir 0,5 mL dessa solução em 20 mL de água purificada.

Frascos de enchimento: colocar as soluções descritas a seguir em quatro frascos separados compatíveis com o sistema de injeção.

Frasco branco: 1 mL de água purificada.

Frasco referência: 0,5 mL da *Solução de referência* e 0,5 mL da *Solução de padrão interno*.

Frasco de teste A: a 10 mg da amostra adicionar 1 mL de água purificada.

Frasco de teste B: a 10 mg da amostra adicionar 0,5 mL de água purificada e 0,5 mL da *Solução de padrão interno*.

Procedimento: equilibrar cada frasco no sistema *headspace* a 90 °C durante 15 minutos. O tempo de pressurização da pré-injeção é de um minuto. O cromatograma obtido a partir do *Frasco referência* apresenta dois picos que correspondem ao álcool etílico e ao 2-propanol no sentido em que o tempo de retenção aumenta (com tempos de retenção de aproximadamente dois minutos e meio e quatro minutos). Calcular o teor de álcool etílico (m/m) levando em consideração sua densidade a 20 °C, que deve ser de 0,792 g/mL.

Grupos N-NO. No máximo 0,25 ppm, determinado por clivagem da ligação N-NO, com ácido bromídrico em acetato de etila sob um condensador de refluxo e posterior detecção do NO (óxido nítrico) liberado por quimioluminescência. Utilizar o aparelho ilustrado na **Figura 1**.

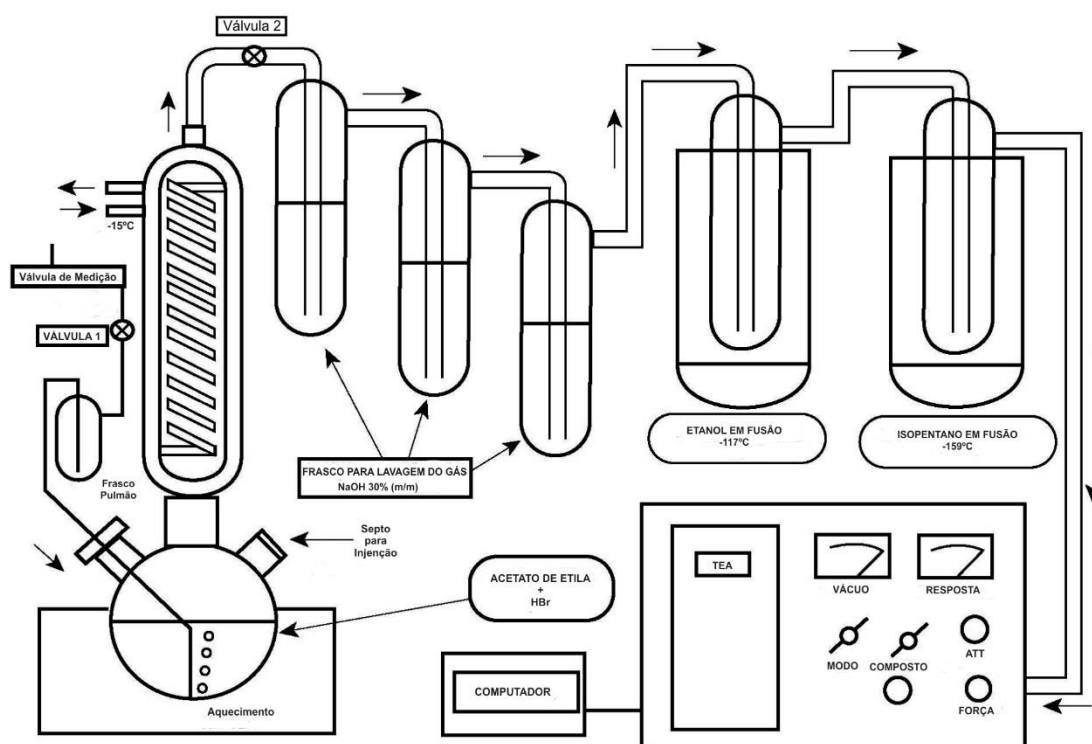


Figura 1 – Esquema do aparelho a ser utilizado na determinação de N-NO.

Descrição do aparelho (Figura 1). Utilizar um balão de vidro borossilicado, de fundo redondo, de 500 mL, com três juntas, acima do qual está ligado um condensador que é equipado com:
- de um lado, uma junta torion através da qual pode ser introduzida uma corrente de argônio, por uma cânula;

- do outro lado, um conjunto de parafuso com um pistão equipado com um septo através do qual a *Solução de referência* e uma *Solução amostra* serão injetadas.

O balão de fundo redondo é ligado em série a três armadilhas de bolhas que são eles próprios ligados a duas armadilhas frias, que são por sua vez ligadas a um detector de quimioluminescência. Tubulação adequada garante que as junções são estanques.

Preparação do detector de quimioluminescência: ligar o detector de quimioluminescência 48 horas antes da utilização e ligar a bomba de vácuo. O vácuo deve ser inferior a 0,5 mmHg. Uma hora antes da utilização, abrir a válvula de oxigênio a uma pressão de 0,2 MPa e uma velocidade de fluxo de 9,4 mL/minuto.

Preparação do borbulhador: em cada borbulhador, colocar 30 mL de uma solução de 300 g/L de hidróxido de sódio SR em água purificada.

- Armadilha em -120 °C: lentamente, adicionar nitrogênio líquido em um balão isotérmico contendo 250 mL de álcool etílico, utilizando uma espátula de madeira para manter a agitação até que uma pasta seja obtida. Colocar a armadilha fria no balão isotérmico preparado como descrito.

- Armadilha em -160 °C: lentamente, adicionar nitrogênio líquido para um balão isotérmico contendo 250 mL de 2-metilbutano utilizando uma espátula de madeira para manter a agitação até que uma pasta seja obtida. Colocar a armadilha fria no balão isotérmico preparado como descrito.

Secagem em balão de vidro de 500 mL borossilicato de fundo redondo e condensador: ferver 50 mL de acetato de etila sob refluxo durante uma hora sob atmosfera de argônio sem ligar o sistema detector de quimioluminescência.

Solução amostra: secar a substância a ser examinada durante 12 horas em pentóxido de difósforo a 60 °C sob vácuo. Dissolver 0,10 g da substância tratada de modo a ser examinada em 1 mL de formamida. Agitar a solução obtida durante 30 minutos.

Solução de referência: diluir 0,1 mL de solução nitrosodipropilamina em 6 mL de álcool etílico. Diluir 0,1 mL da solução obtida em 1,0 mL de formamida (esta solução é equivalente a 0,05 ppm de grupos N-NO).

Introduzir 50 mL de acetato de etila em balão de vidro borossilicato de 500 mL de fundo redondo seco e equipado com um septo. Ligar o balão de fundo redondo para o condensador, que foi previamente resfriado a -15 °C durante duas horas.

Ligar a cânula de argônio e ajustar a taxa de fluxo para 0,1 litro/minuto. Verificar se o sistema é livre de vazamentos. Apenas o conector para o detector de quimioluminescência permanece aberto, a fim de evitar excesso de pressão. Aquecer o acetato de etila até à ebulição.

Evacuar o sistema rodando lentamente a válvula do detector de quimioluminescência. Ao mesmo tempo, apertar a entrada do detector de quimioluminescência. Quando o sistema é equilibrado, o vácuo atinge 4 mmHg. O sinal do ajuste zero no detector de quimioluminescência é definido como 10% da escala completa do gravador. Através do septo do balão de vidro borossilicato de 500 mL de fundo redondo, injetar sequencialmente 0,5 mL de água purificada, 2 mL de ácido bromídrico diluído e, em seguida, 2 mL de uma outra amostra de ácido bromídrico diluído, certificando-se que a caneta do gravador tenha voltado à linha de base entre cada injeção. Injetar 50 µL da *Solução de referência* e, em seguida, 50 µL da *Solução amostra* após a caneta do gravador voltar à linha de base. Calcular a concentração dos grupos N-NO da substância a ser examinada.

Sulfatos livres. No máximo 0,5% (m/v). Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*, utilizando um instrumento equipado a um detector de condutividade. Utilizar um detector com uma sensibilidade de 30 μ S. Utilizar coluna de separação aniônica com 50 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno; utilizar como sistema de neutralização química uma micromembrana de neutralização de acordo com a fase móvel para a detecção de ânion.

Solução amostra: dissolver 30 mg da amostra em água purificada e diluir até 10 mL utilizando o mesmo solvente.

Solução de referência: dissolver 1,4787 g de sulfato de sódio anidro em água e diluir até 1000 mL utilizando o mesmo solvente. Diluir 1 mL desta solução para 200 mL com água destilada (5 ppm de íons sulfato).

Procedimento: eluir com uma solução de 1,91 g de tetraborato dissódico em 1000 mL de água purificada como fase móvel durante 15 minutos, mudar para 100% de hidróxido de sódio 0,1 M durante um período de meio minuto; eluir com essa solução durante 10 minutos; voltar às condições iniciais por um período de meio minuto; a taxa de fluxo é 1 mL/minuto.

Bombear continuamente o sistema de neutralização química em contrafluxo com uma solução de ácido sulfúrico a 2,45 g/L, a uma taxa de fluxo de 4 mL/minuto. Injetar 50 μ L de cada solução. O cromatograma obtido com a solução de referência apresenta um pico principal que corresponde ao íon sulfato (tempo de retenção de aproximadamente 7,5 minutos). Alterar a composição da fase móvel, se necessário, para obter o tempo de retenção fixo. Calcular o teor de sulfato da substância a ser examinada.

SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE)

Immuneserum bothropicum

O soro antibotrópico (pentavalente) é uma solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados com antígeno do gênero *Bothrops*, composto por venenos das serpentes *Bothrops jararaca*; *Bothrops jararacussu*; *Bothrops moojeni*; *Bothrops alternatus* e *Bothrops neuwiedi*. Cumpre as especificações e testes prescritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*. Contém em cada mililitro imunoglobulinas suficientes para neutralizar 5 mg do veneno de referência de *B. jararaca*.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*, utilizando como antígeno veneno de *B. jararaca*.

B. Atende aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Proceder conforme descrito em *Características* na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proceder conforme descrito em *Ensaio físico-químico* na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Proceder conforme descrito em *Testes de segurança biológica* na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

DOSEAMENTO

Com o ensaio de potência da amostra tem-se como objetivo determinar a dose neutralizante necessária - Dose Efetiva 50% (DE₅₀) para proteger animais suscetíveis contra os efeitos letais de uma dose fixa do *Veneno de referência*.

Veneno de referência: mistura homogênea de venenos que representam a distribuição geográfica da espécie *B. jararaca*. Deve ser liofilizado e mantido a -20 °C. O veneno é padronizado pela determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀).

Determinação da DL₅₀ do veneno: reconstituir a preparação liofilizada de veneno para determinada concentração peso por volume, com solução fisiológica 0,85% (p/v). Efetuar diluições em progressão geométrica com o mesmo diluente, utilizando fator de diluição constante, não superior a 1,5, e igualando os volumes finais. Inocular, por via intraperitoneal, um volume de 0,5 mL por camundongo de cada diluição em grupos de, no mínimo, 10 camundongos albinos suíços de 18 g a 22 g. Observar os animais até 48 horas após a inoculação e registrar o número de mortos em cada diluição. Calcular a DL₅₀ utilizando método estatístico adequado. A faixa de resposta (porcentagem de mortes) deve estar entre a maior e a menor diluição utilizada, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio, quanto menores forem os seus limites. Expressar o resultado em microgramas de veneno por 0,5 mL.

Determinação da potência do soro: efetuar diluições progressivas da amostra em solução fisiológica 0,85% (p/v), utilizando fator de diluição constante, não superior a 1,5, de maneira que o volume final após a mistura com a dose desafio de veneno seja idêntico em todos os tubos de ensaio. Reconstituir e diluir o *Veneno de referência* com solução fisiológica 0,85% (p/v) e adicionar em cada tubo volume constante, de modo que cada dose a ser inoculada por animal contenha 5 DL₅₀. Homogeneizar e incubar a mistura a 37 °C por 60 minutos. Inocular, por via intraperitoneal, um volume de 0,5 mL por camundongo de cada mistura em grupos de, no mínimo, oito camundongos albinos suíços de 18 a 22 g. Observar os animais até 48 horas após a inoculação e registrar o número de vivos em cada mistura da amostra em teste. Calcular a Dose Efetiva 50% (DE₅₀) em microlitros, utilizando método estatístico adequado. A faixa de resposta produzida (porcentagem de sobrevivência) deve estar entre a maior e a menor diluição utilizada, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio, quanto menores forem os seus limites. Calcular a potência em miligramas por mililitro da amostra, segundo a expressão:

$$Potência \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{T_v - 1}{DE_{50}} \times DL_{50} \text{ do veneno}$$

em que

T_v = número de DL₅₀ utilizadas por camundongo na dose teste do veneno.

No mínimo 5 mg/mL. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE) E ANTI LAQUÉTICO

Immunoserum bothropicum-laqueticum

O soro antibotrópico (pentavalente) e laquético é uma solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados com venenos de *Bothrops jararaca*; *Bothrops jararacussu*; *Bothrops moojeni*; *Bothrops alternatus*; *Bothrops neuwiedi* e *Lachesis muta*. Cumpre com as especificações e testes prescritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*. Contém em cada mililitro imunoglobulinas suficientes para neutralizar 5 mg e 3 mg dos venenos de referência de *B. jararaca* e *L. muta*, respectivamente.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*, utilizando como antígenos venenos de *B. jararaca* e *L. muta*.

B. Satisfaz aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Proceder conforme descrito em *Características* na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proceder conforme descrito em *Ensaio físico-químico* na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Proceder conforme descrito em *Testes de segurança biológica* na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

DOSEAMENTO

Fração botrópica

Determinar a potência conforme descrito na monografia de *Soro antibotrópico (pentavalente)*. No mínimo 5 mg/mL. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Fração laquética

Com o ensaio de potência da amostra tem-se como objetivo determinar a dose neutralizante necessária (Dose Efetiva 50%) para proteger animais suscetíveis contra os efeitos letais de uma dose fixa do *Veneno de referência*.

Veneno de referência: mistura homogênea de venenos que representam a distribuição geográfica da espécie *L. muta*. Deve ser liofilizado e mantido a -20 °C. O veneno é padronizado considerando a determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀).

Determinação da DL₅₀ do veneno: proceder conforme descrito em *Determinação da DL₅₀ do veneno* na monografia de *Soro antibotrópico (pentavalente)*.

Determinação da potência do soro: proceder conforme descrito em *Determinação da potência do soro* na monografia de *Soro antibotrópico (pentavalente)*.

No mínimo 3 mg/mL. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE) E ANTICROTÁLICO **Immunoserum bothropicum-crotalicum**

soro antibotrópico (pentavalente) e anticrotático; 09974

O soro antibotrópico (pentavalente) e anticrotático é uma solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados com venenos de *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops neuwiedi* e *Crotalus durissus*. Cumpre as especificações e testes prescritos na monografia *Soros hiperimunes para uso humano*. Contém, em cada mililitro, imunoglobulinas suficientes para neutralizar 5 mg e 1,5 mg de venenos de referência de *B. jararaca* e *C. durissus terrificus*, respectivamente.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia *Soros hiperimunes para uso humano*, utilizando como antígenos venenos de *B. jararaca* e *C. durissus terrificus*.

B. Atende aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Proceder conforme descrito em *Características* da monografia *Soros hiperimunes para uso humano*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proceder conforme descrito em *Ensaio físico-químico* da monografia *Soros hiperimunes para uso humano*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Proceder conforme descrito em *Testes de segurança biológica* da monografia *Soros hiperimunes para uso humano*.

DOSEAMENTO

Fração botrópica

Determinar a potência, conforme descrito em *Doseamento* da monografia *Soro antibotrópico (pentavalente)*.

Fração crotática

Determinar a potência conforme descrito em *Doseamento* da monografia *Soro anticrotático*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumprir o estabelecido na monografia *Soros hiperimunes para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE), ANTICROTÁLICO E ANTILAQUÉTICO

Immunoserum bothropicum-laqueticumcrotalicum

soro antibotrópico (pentavalente), anticrotálico e antilaquético; 09976

O soro antibotrópico (pentavalente), anticrotálico e antilaquético é uma solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados com venenos de *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops neuwiedi*, *Lachesis muta* e *Crotalus durissus*. Cumpre com as especificações e controles prescritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*. Contém, em cada mililitro, imunoglobulinas suficientes para neutralizar, no mínimo, 5 mg, 3 mg e 1,5 mg de venenos de referência de *B. jararaca*, *L. muta* e *C. durissus terrificus*, respectivamente.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*, utilizando como antígenos venenos de *B. jararaca*, *L. muta* e *C. durissus terrificus*.

B. Atende aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Cumpre as *Características* descritas na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Cumpre os *Ensaio físico-químicos* descritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Cumpre os *Testes de segurança biológica* descritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

DOSEAMENTO

Fração botrópica

Proceder conforme descrito em *Doseamento* na monografia de *Soro antibotrópico (pentavalente)*.

Fração crotálica

Proceder conforme descrito em *Doseamento* na monografia de *Soro anticrotálico*.

Fração laquética

Proceder conforme descrito em *Doseamento* na monografia de *Soro antibotrópico (pentavalente) e antilaquético*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpre o estabelecido na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

SORO ANTIBOTULÍNICO (TRIVALENTE) Immunoserum botulinicum

O soro antibotulínico (trivalente) é uma solução que contém imunoglobulinas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados contra toxinas tipo A, tipo B e tipo E produzidas pelo *Clostridium botulinum*. Cumpre as especificações e testes prescritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*. Contém, em cada mililitro, no mínimo, 375 UI, 275 UI e 425 UI de antitoxina para cada um dos tipos A, B e E, respectivamente.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*, utilizando como antígenos as toxinas tipos A, B e E produzidas pelo *C. botulinum*.

B. Atende aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Proceder conforme descrito em *Características* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proceder conforme descrito em *Ensaio físico-químico* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Proceder conforme descrito em *Testes de segurança biológica* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

DOSEAMENTO

Com o ensaio de potência da amostra tem-se como objetivo determinar a dose neutralizante necessária para proteger os animais utilizados na prova contra os efeitos letais de uma dose teste de cada um dos tipos de toxinas de referência. A dose do soro em teste é comparada com a dose da *Antitoxina botulínica de referência* necessária para conferir a mesma proteção.

Antitoxinas botulínicas de referência: os padrões internacionais de referência das antitoxinas dos tipos A, B ou E são distribuídos aos laboratórios de produção e controle em ampolas que contêm soro equino hiperimune liofilizado, que especificamente neutraliza a toxina botulínica do tipo a que se refere. A equivalência do padrão internacional em unidades internacionais é estabelecida periodicamente pela Organização Mundial da Saúde.

Determinação da dose teste de toxina (L+/10): proceder conforme descrito em *Determinação da dose teste de toxina (L+/10)* da monografia de *Soro antitetânico* ou extrapolando os valores para L+ ou L+/100. As misturas (toxina+antitoxina) são incubadas à temperatura ambiente ou entre 20 °C e 24 °C por 60 minutos.

Determinação da potência do soro: diluir a toxina referência para uma dose de L+/10, com solução de gelatina fosfatada (0,2% de gelatina dissolvida em tampão fosfato de sódio dibásico 0,05 M, pH 6,5 e autoclavada a 120 °C durante 15 minutos). A uma série de tubos de ensaio, distribuir um volume

constante de toxina botulínica diluída. Adicionar volumes variáveis da amostra. Igualar os volumes para 5 mL com o mesmo diluente. Homogeneizar e incubar à temperatura ambiente ou entre 20 °C e 24 °C por 60 minutos. Inocular em cada camundongo albino suíço ou NIH de 18 a 22 g, por via intraperitoneal, um volume de 0,5 mL em grupos de, no mínimo, oito camundongos por mistura. Observar os animais até 96 horas após a inoculação e registrar o número de mortos. Nas mesmas condições descritas e paralelamente, realizar a prova com a *Antitoxina botulínica de referência*, com o objetivo de verificar-se a validade da prova e estabelecer correlação no cálculo do título. Determinar as doses efetivas 50% (DE₅₀) da amostra e da *Antitoxina botulínica de referência*, utilizando um método estatístico adequado. Para a determinação ser considerada válida é necessário que: (a) a faixa de resposta produzida (DE₅₀) esteja entre a maior e a menor diluição utilizada na amostra teste e padrão, formando a curva de regressão que deve apresentar uma relação linear; (b) os limites de confiança ($P = 0,95$) devem estar entre 50% e 200% da potência calculada. Calcular a potência do soro em teste, segundo a expressão:

$$\text{Potência} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{DE}_{50} \text{ da amostra testada}}{\text{DE}_{50} \text{ da antitoxina de referência}} \times \frac{\text{UI}}{\text{mL}} \text{ da antitoxina de referência}$$

No mínimo 375 UI/mL, 275 UI/mL e 425 UI/mL de antitoxina para cada um dos tipos A, B e E, respectivamente. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumprir o estabelecido na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

SORO ANTICROTÁLICO

Immunoserum crotalicum

O soro anticrotálico é uma solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados com veneno de *Crotalus durissus*. Cumpre com as especificações e testes prescritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*. Contém, em cada mililitro, imunoglobulinas suficientes para neutralizar 1,5 mg de veneno de referência de *C. durissus terrificus*.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*, utilizando como antígeno veneno de *C. durissus terrificus*.

B. Satisfaz aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Proceder conforme descrito em *Características* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proceder conforme descrito em *Ensaio físico-químico* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Proceder conforme descrito em *Testes de segurança biológica* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

DOSEAMENTO

Com o ensaio de potência da amostra tem-se como objetivo determinar a dose neutralizante necessária (Dose Efetiva 50%) para proteger animais suscetíveis contra os efeitos letais de uma dose fixa do *Veneno de referência*.

Veneno de referência: mistura homogênea de venenos que representam a distribuição geográfica da espécie *C. durissus terrificus*. Deve ser liofilizado e mantido a -20 °C. O veneno é padronizado pela determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀).

Determinação da DL₅₀ do veneno: proceder conforme descrito em *Determinação da DL₅₀ do veneno* da monografia de *Soro antibotrópico (pentavalente)*.

Determinação da potência do soro: proceder conforme descrito em *Determinação da potência do soro* da monografia de *Soro antibotrópico (pentavalente)*.

No mínimo 1,5 mg/mL. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

SORO ANTIDIFTÉRICO

Immunoserum diphthericum

O soro antidiftérico é uma solução que contém imunoglobulinas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados contra a toxina produzida pelo *Corynebacterium diphtheriae*. Cumpre as especificações e testes prescritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*. Contém, em cada mililitro, no mínimo, 1000 UI de antitoxina.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*, utilizando como antígeno a toxina do *C. diphtheriae*.

B. Atende aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Proceder conforme descrito em *Características* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proceder conforme descrito em *Ensaio físico-químico* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Proceder conforme descrito em *Testes de segurança biológica* da monografia *Soros hiperimunes para uso humano*.

DOSEAMENTO

Com o ensaio de potência da amostra tem-se como objetivo determinar a dose neutralizante necessária para proteger os animais utilizados na prova contra os efeitos letais de uma dose teste da *Toxina diftérica de referência*. A dose do soro em teste é comparada com a dose da *Antitoxina diftérica de referência* necessária para conferir a mesma proteção.

Antitoxina diftérica de referência: o padrão internacional de referência da antitoxina diftérica é distribuído aos laboratórios de produção e controle em ampolas que contêm soro equino hiperimune liofilizado, que especificamente neutraliza a toxina diftérica. O título nominal do padrão de referência secundário deve ser aferido, periodicamente, em unidades internacionais contra o padrão de referência internacional.

Toxina diftérica de referência: é preparada a partir de filtrados estéreis de sobrenadantes de cultivos líquidos de *C. diphtheriae*. O filtrado deve ser concentrado, purificado por métodos físicos ou químicos e liofilizado. Após a reconstituição da toxina, adicionar solução salina glicerinada e armazenar a -20 °C.

Determinação da dose teste de toxina (L+): diluir a *Antitoxina diftérica de referência* para 5 UI/mL, com solução fisiológica a 0,85% (p/v). Diluir a *Toxina diftérica de referência* para concentração conhecida, com solução fisiológica a 0,85% (p/v). Em uma série de tubos de ensaio, adicionar volumes variáveis de toxina e volume constante da *Antitoxina diftérica de referência* diluída. Igualar

os volumes com solução fisiológica a 0,85% (p/v). Homogeneizar e incubar a 37 °C por 60 minutos. Inocular em cada cobaia de 250 g a 350 g, por via subcutânea, com volume que contenha 1 UI de *Antitoxina diftérica de referência* em grupos de, no mínimo, quatro cobaias por mistura. Observar os animais até 96 horas e registrar o número de mortos em cada diluição. O L+ (limite morte) ou dose teste da toxina é a menor quantidade de toxina, que, quando combinada com 1 UI de *Antitoxina diftérica de referência*, provoca a morte dos animais no período de observação estipulado.

Determinação da potência do soro: diluir a *Toxina diftérica de referência* com solução fisiológica a 0,85% (p/v) para uma dose de 10 L+. Em uma série de tubos de ensaio, distribuir volumes variáveis da amostra. Adicionar 1 mL da *Toxina diftérica de referência* diluída. Igualar os volumes para 10 mL com o mesmo diluente. Homogeneizar e incubar as misturas a 37 °C por 60 minutos. Inocular uma dose de 2 mL em cada uma das cobaias de 250 g a 350 g, por via subcutânea, em grupos de, no mínimo, quatro cobaias por mistura. Observar os animais até 96 horas após a inoculação e registrar o número de mortos. Nas mesmas condições descritas e paralelamente, realizar a prova com a *Antitoxina diftérica de referência*, com o objetivo de verificar a validade da prova e estabelecer correlação no cálculo do título. Determinar as doses efetivas 50% (DE₅₀) da amostra e da *Antitoxina diftérica de referência*, utilizando um método estatístico adequado. Para a determinação ser considerada válida é necessário que: (a) a faixa de resposta produzida (DE₅₀) esteja entre a maior e a menor diluição utilizada na amostra teste e padrão, formando a curva de regressão que deve apresentar uma relação linear; (b) os limites de confiança ($P = 0,95$) devem estar entre 50% e 200% da potência calculada. Calcular a potência do soro em teste, segundo a expressão:

$$\text{Potência} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{DE}_{50} \text{ da amostra testada}}{\text{DE}_{50} \text{ da antitoxina de referência}} \times \frac{\text{UI}}{\text{mL}} \text{ da antitoxina de referência}$$

No mínimo 1000 UI/mL. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Alternativamente, pode ser utilizado um método *in vitro*, como ELISA ou teste em célula VERO, desde que sejam validados contra o teste de soroneutralização descrito.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

SORO ANTIELAPÍDICO (BIVALENTE)

Immunoserum elapidicum

O soro antielapídico (bivalente) é uma solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados com veneno de *Micrurus frontalis* e *Micrurus corallinus*. Cumpre as especificações e testes descritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*. Contém, em cada mililitro, imunoglobulinas suficientes para neutralizar 1,5 mg do veneno de referência de *M. frontalis*.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*, utilizando como antígeno veneno de *M. frontalis*.

B. Satisfaz aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Proceder conforme descrito em *Características* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proceder conforme descrito em *Ensaio físico-químico* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Proceder conforme descrito em *Testes de segurança biológica* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

DOSEAMENTO

Com o ensaio de potência da amostra tem-se como objetivo determinar a dose neutralizante necessária (Dose Efetiva 50%) para proteger animais suscetíveis contra os efeitos letais de uma dose fixa do *Veneno de referência*.

Veneno de referência: mistura homogênea de venenos que representam a distribuição geográfica da espécie *Micrurus frontalis*. Deve ser liofilizado e mantido a -20 °C. O veneno é padronizado pela determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀).

Determinação da DL₅₀ do veneno: proceder conforme descrito em *Determinação da DL₅₀ do veneno* da monografia de *Soro antibotrópico (pentavalente)*.

Determinação da potência do soro: proceder conforme descrito em *Determinação da potência do soro* da monografia de *Soro antibotrópico (pentavalente)*.

No mínimo 1,5 mg/mL. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

SORO ANTIESCORPIÔNICO

Immunoserum escorpionicum

O soro antiescorpiônico é uma solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados com antígeno do gênero *Tityus serrulatus*. Cumpre as especificações e testes prescritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*. Contém, em cada mililitro, imunoglobulinas suficientes para neutralizar 1,0 mg do veneno de referência de *Tityus serrulatus*.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*, utilizando como antígeno veneno de *T. serrulatus*.

B. Satisfaz aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Proceder conforme descrito em *Características* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proceder conforme descrito em *Ensaio físico-químico* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Proceder conforme descrito em *Testes de segurança biológica* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

DOSEAMENTO

Com o ensaio de potência da amostra tem-se como objetivo determinar a dose neutralizante necessária (Dose Efetiva 50%) para proteger animais suscetíveis contra os efeitos letais de uma dose fixa do *Veneno de referência*.

Veneno de referência: mistura homogênea de venenos que representam a distribuição geográfica da espécie *Tityus serrulatus*. Deve ser liofilizado e mantido a -20 °C. O veneno é padronizado pela determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀).

Determinação da DL₅₀ do veneno: proceder conforme descrito em *Determinação da DL₅₀ do veneno* da monografia de *Soro antibotrópico (pentavalente)*.

Determinação da potência do soro: proceder conforme descrito em *Determinação da potência do soro* da monografia de *Soro antibotrópico (pentavalente)*.

No mínimo 1,0 mg/mL. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

SORO ANTILONÔMICO

Immunoserum lonomicum

O soro antilonômico é uma solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados com extrato de *Lonomia obliqua*. Cumpre as especificações e controles prescritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*. Contém, em cada mililitro, imunoglobulinas suficientes para neutralizar 0,35 mg de veneno de referência de *L. obliqua*.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*, utilizando como antígeno veneno do extrato das cerdas de *Lonomia obliqua*.

B. Satisfaz aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Proceder conforme descrito em *Características* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proceder conforme descrito em *Ensaio físico-químico* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Proceder conforme descrito em *Testes de segurança biológica* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

DOSEAMENTO

Com o ensaio de potência tem-se como objetivo determinar a dose neutralizante necessária (Dose Efetiva 50%) para proteger os animais suscetíveis contra a incoagulabilidade sanguínea provocada por uma dose fixa do veneno de *L. obliqua*.

Veneno de referência: veneno extraído de *L. obliqua* por maceração das cerdas com solução salina tamponada. Após a centrifugação do extrato, o sobrenadante contendo o veneno é distribuído em frascos e deve ser mantido a -20 °C. O veneno é padronizado pela determinação da Dose de Incoagulabilidade 50% (DI₅₀).

Determinação da DI₅₀ do veneno: efetuar diluições do *Veneno de referência* com solução fisiológica a 0,85% (p/v), utilizando fator de diluição constante de 1:1 a 1:5, e igualando os volumes finais com o mesmo diluente. Inocular, por via intraperitoneal, 0,5 mL por camundongo, de cada diluição, em grupos de, no mínimo, seis camundongos BALB/c, machos, de 18 g a 22 g. Observar os animais por duas horas após a inoculação e coletar, com o auxílio de pipeta Pasteur, aproximadamente, 300 µL de sangue por punção do plexo retro-orbital. Transferir para tubo de ensaio e determinar o tempo de coagulação por observação visual. O tempo máximo de coagulação é de dois minutos. As amostras de sangue que não formam coágulo no intervalo de tempo estipulado são consideradas como incoaguláveis. Registrar o número de animais com ausência de coagulação sanguínea e o total de

animais sangrados. Calcular a DI_{50} utilizando método estatístico adequado. A faixa de resposta (porcentagem de incoaguláveis) deve estar entre a maior e a menor diluição utilizada na amostra teste, formando a curva de regressão em que deve existir relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio, quanto menores forem os seus limites. Expressar o resultado em microgramas de veneno por 0,5 mL.

Determinação da potência do soro: efetuar diluições progressivas da amostra em solução fisiológica a 0,85% (p/v), utilizando fator de diluição constante de 1:1 a 1:5, de maneira que o volume final após a mistura com a dose desafio de 3 DI_{50} do *Veneno de referência* seja idêntico em todos os tubos de ensaio. Homogeneizar e incubar a mistura a 37 °C por 60 minutos. Inocular, por via intraperitoneal, 0,5 mL por camundongo, de cada mistura, em grupos de pelo menos seis camundongos BALB/c, machos, de 18 g a 22 g. Observar os animais até duas horas após a inoculação e, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, coletar aproximadamente 300 µL de sangue por punção do complexo retro-orbital. Transferir para tubo de ensaio e determinar o tempo de coagulação por observação visual. As amostras de sangue que formam coágulo no intervalo de até dois minutos são consideradas como coaguláveis. Registrar o número de animais nos quais ocorre coagulação sanguínea e o total de animais sangrados. Calcular a Dose Efetiva 50% (DE_{50}) em microlitros, utilizando método estatístico adequado. A faixa de resposta (porcentagem de coaguláveis) deve estar entre a maior e a menor diluição utilizada na amostra teste, formando a curva de regressão que deve apresentar relação linear. Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio, quanto menores forem seus limites. Calcular a potência, em miligramas por mililitro, segundo a expressão:

$$Potência \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{T_v - 1}{DE_{50}} \times DI_{50} \text{ do veneno}$$

em que,

T_v = número de DI_{50} utilizada por camundongo na dose teste do veneno.

O título da potência é expresso em miligramas de veneno neutralizados por mL da amostra. No mínimo 0,35 mg/mL. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

SORO ANTILOXOSCÉLICO (TRIVALENTE)

Immunoserum loxoscelicum

soro antiloxoscélico (trivalente); 09983

O soro antiloxoscélico é uma solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados com antígeno do gênero *Loxosceles*, composto por venenos das aranhas *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta*. Cumpre as especificações e controles prescritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*. Cada mililitro contém imunoglobulinas suficientes para neutralizar 15 doses mínimas necrosantes (DMN) de veneno de referência de *L. intermedia*.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*, utilizando como antígeno veneno de *L. intermedia*.

B. Atende aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Cumpre as *Características* descritas na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Cumpre os *Ensaios físico-químicos* descritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Cumpre os *Testes de segurança biológica* descritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

DOSEAMENTO

Com o ensaio de potência tem-se como objetivo determinar a dose neutralizante necessária para proteger animais suscetíveis contra os efeitos dermonecroticos de uma Dose Mínima Necrosante (DMN) do *Veneno de referência*.

Veneno de referência: veneno extraído de *L. intermedia*, o qual deve ser liofilizado ou cristalizado e mantido a -20 °C. O veneno é padronizado pela determinação da DMN, que é a menor quantidade de veneno capaz de provocar, em até 72 horas, uma necrose de aproximadamente um centímetro de diâmetro, por injeção intradérmica na face interna da orelha de coelho.

Determinação da DMN de veneno: reconstituir a preparação liofilizada ou cristalizada de veneno para determinada concentração (p/v) com solução fisiológica a 0,85% (p/v). Efetuar diluições em progressão geométrica com o mesmo diluente, iniciando com uma dose de 3 mg de veneno e utilizando fator de diluição constante, não superior a 1,5.

Inocular, em dois coelhos albinos de 1,8 kg a 2,3 kg, por via intradérmica, um volume de 0,1 mL de cada diluição na face interna das duas orelhas de cada coelho. Observar os animais até 72 horas após a inoculação, registrar o aparecimento de dermonecrose e medir as lesões. A DMN é calculada segundo a expressão:

$$DMN = \frac{A + B}{2}$$

em que,

DMN = dose mínima necrótica (cm);

A = média entre os diâmetros máximos nos quatro pontos inoculados;

B = média entre os diâmetros mínimos nos quatro pontos inoculados.

O resultado é expresso pela menor quantidade, em mg, de veneno, capaz de provocar uma lesão dermonecrotica de aproximadamente 1 cm de diâmetro.

Determinação da potência do soro: efetuar diluições da amostra em solução fisiológica a 0,85% (p/v), de forma a determinar a maior diluição que neutraliza 1 DMN do *Veneno de referência*, utilizando um fator de diluição constante, não superior a 1,5. Reconstituir e diluir o *Veneno de referência* com solução fisiológica a 0,85% (p/v), de modo que cada dose de 0,1 mL a ser inoculada por animal contenha 1 DMN. Injetar, por via intradérmica, a dose de 0,1 mL dessa diluição do *Veneno de referência* na face interna de uma das orelhas de cada um de três coelhos. Em seguida, administrar 1 mL de soro diluído na veia marginal da orelha oposta àquela em que foi inoculado o veneno. Em paralelo, realizar um controle do veneno por meio da inoculação de 1 DMN por orelha em, no mínimo, mais um coelho. Observar os animais até 72 horas após a inoculação, quanto ao aparecimento de dermonecrose. Registrar a maior diluição do soro que não provoca necrose. O título da potência é expresso em DMN de veneno neutralizado, por mililitro do soro.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente

SORO ANTIRRÁBICO

soro antirrábico; 09984

O soro antirrábico é uma solução que contém imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados contra o vírus da raiva. Na imunização dos animais são utilizadas cepas de vírus fixo inativado ou não, replicadas em cultivo de células distintas daquelas utilizadas na preparação da vacina raiva (inativada) de uso humano. Cumpre as especificações e controles prescritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*. Contém, em cada mililitro, no mínimo, 200 UI.

IDENTIFICAÇÃO

Os métodos de *Doseamento* podem ser utilizados.

CARACTERÍSTICAS

Proceder conforme descrito em *Características* da monografia *Soros hiperimunes para uso humano*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proceder conforme descrito em *Ensaio físico-químico* da monografia *Soros hiperimunes para uso humano*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Proceder conforme descrito em *Testes de segurança biológica* da monografia *Soros hiperimunes para uso humano*.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Método de soroneutralização em camundongos.

Com o ensaio de potência da amostra tem-se como objetivo determinar a dose neutralizante necessária (Dose Efetiva 50%) para proteger camundongos contra os efeitos letais de uma dose desafio de vírus rábico. Para avaliação comparativa da potência da amostra, utiliza-se soro equino liofilizado de referência, aferido em unidades internacionais, pelo soro padrão internacional distribuído pela Organização Mundial da Saúde.

Vírus desafio: cepa CVS (challenge virus standard), de Dose Letal 50% (DL₅₀) conhecida.

Determinação da DL₅₀: efetuar diluições decimais seriais de vírus com solução de água destilada contendo 2% (v/v) de soro normal de origem animal ou 0,75% (p/v) de albumina bovina. Homogeneizar e inocular, por via intracerebral, um volume de 30 µL de cada diluição em grupos de, no mínimo, 10 camundongos albinos suíços de 10 g a 15 g. Observar os animais durante 14 dias. Calcular a DL₅₀ por método estatisticamente comprovado, utilizando o número em cada grupo que morrer ou desenvolver sintomas de raiva, entre o 5º e 14º dias. A faixa de resposta produzida (porcentagem de mortes) deve estar entre a maior e a menor diluição utilizada, formando a curva de regressão, que deve apresentar uma relação linear.

Determinação da potência do soro: efetuar diluições seriadas da amostra, com o mesmo diluente descrito na *Determinação da DL₅₀*, utilizando fator de diluição constante, não superior a 2, até que seja atingida diluição em que, supostamente, não haja neutralização. Transferir para tubos de ensaio um volume constante de cada uma das quatro últimas diluições. Preparar diluição do *Vírus desafio*, para que contenha 100 DL₅₀ a 500 DL₅₀ iniciais, utilizar o mesmo diluente. Adicionar em cada um dos quatro tubos, já contendo soro, o mesmo volume da diluição de desafio, de maneira que sejam obtidas diluições dobradas de vírus, que contenha 50 DL₅₀ a 250 DL₅₀ da amostra em teste. Homogeneizar as misturas. Proceder de maneira idêntica para o soro de referência. Paralelamente, para determinar o número real de DL₅₀ utilizado como desafio, preparar quatro diluições decimais sucessivas com o mesmo diluente, a partir da diluição utilizada como desafio. Distribuir um volume constante de diluente em cada um de quatro tubos de ensaio e transferir para os mesmos, iniciando pela diluição desafio, o mesmo volume de cada uma das diluições seriadas de vírus. Homogeneizar, obtendo diluições dobradas do vírus desafio. Incubar as misturas de soros mais vírus e vírus mais diluente em banho-maria a (37 ± 0,5) °C, durante 90 minutos. Inocular, por via intracerebral, um volume de 30 µL de cada mistura, em grupos de, pelo menos, oito camundongos albinos suíços de 10 g a 15 g. Observar os animais de cada grupo durante 14 dias e registrar o número de animais que morreram ou apresentaram sintomas de raiva, no período de 5 a 14 dias após o desafio.

Calcular as Doses Efetivas 50% (DE₅₀) da amostra e do soro de referência, assim como a DL₅₀ do vírus desafio, por método estatisticamente validado. A faixa de resposta produzida (porcentagem de sobrevivência) deve estar entre a maior e a menor diluição utilizada na amostra teste e padrão, formando a curva de regressão, que deve apresentar uma relação linear. A potência é determinada segundo a expressão:

$$\text{Potência} \left| \frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right| = \frac{\text{DE}_{50} \text{ da amostra em teste} \times \text{conc. em } \frac{\text{UI}}{\text{mL}} \text{ do soro de referência}}{\text{DE}_{50} \text{ do soro de referência}}$$

A potência estimada deve ser de, no mínimo, 200 UI/mL e os limites de confiança não devem estar abaixo de 25% ou acima de 400% da atividade determinada.

B. Método de soroneutralização de vírus rábico em células BHK₂₁.

Pré-diluir os soros de referência e amostra teste para a concentração aproximada de 1 UI/mL e fazer diluições em série na razão 2, usando meio Eagle-MEM com 2,5% de soro fetal bovino. Colocar 50 µL de cada uma dessas diluições em microplaca de poliestireno de 96 orifícios e adicionar o mesmo volume de uma diluição de vírus fixo CVS-11 em células BHK₂₁, de forma a obter de 30 a 300 doses formadoras de focos fluorescentes 50% (DFF₅₀) após a mistura com os soros. Na mesma placa fazer uma titulação do vírus CVS-11 com quatro diluições seriadas na base 10, sendo a primeira igual à diluição adicionada aos soros teste e de referência. Incubar a microplaca com as misturas de soro e vírus em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C durante 90 minutos. Em seguida, adicionar a cada orifício 100 µL de uma suspensão contendo 3,7 x 10⁴ células BHK₂₁ em meio Eagle MEM com 2,5% de soro fetal bovino. Em dois orifícios colocar apenas o meio de cultura e as células para controle das mesmas. Incubar novamente a microplaca a 37 °C em estufa com 5% de CO₂ durante 22 horas. Lavar as células com solução salina tamponada com fosfatos pH 8,0 e fixá-las com acetona a 80% resfriada a -20 °C por 15 minutos. Adicionar uma imunoglobulina antinucleocapsídeo rábico conjugada com isotiocianato de fluoresceína e manter a 37 °C durante 30 minutos. Lavar as placas duas vezes em solução salina tamponada com fosfato pH 8,0. Observar oito campos em cada orifício da microplaca em microscópio de fluorescência invertido com aumento de 200 vezes. Considerar positivo o campo que contenha um ou mais focos fluorescentes.

Calcular as Doses Efetivas 50% (DE₅₀) da amostra e do soro de referência, assim como a DL₅₀ do vírus desafio, por método estatisticamente validado. A faixa de resposta produzida (porcentagem de focos fluorescentes) deve estar entre a maior e a menor diluição utilizada na amostra teste e padrão, formando a curva de regressão, que deve apresentar uma relação linear e a análise estatística deve demonstrar uma inclinação significativa das linhas dose/resposta e sem desvios significativos de linearidade e paralelismo. A potência é determinada segundo a expressão:

$$\text{Potência} \left| \frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right| = \frac{\text{DE}_{50} \text{ da amostra em teste} \times \text{conc. em } \frac{\text{UI}}{\text{mL}} \text{ do soro de referência}}{\text{DE}_{50} \text{ do soro de referência}}$$

A potência estimada deve ser de, no mínimo, 200 UI/mL e os limites de confiança não devem estar abaixo de 80% ou acima de 125% da atividade determinada.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia *Soros hiperimunes para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

SORO ANTITETÂNICO

Immuno serum tetanicum ad usum humanum

O soro antitetânico é uma solução que contém imunoglobulinas purificadas, obtidas a partir de plasma de animais hiperimunizados contra a toxina produzida pelo *Clostridium tetani*. Cumpre as especificações e testes prescritos na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*. Contém em cada mililitro, no mínimo, 1000 UI de antitoxina.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*, utilizando como antígeno a toxina de *C. tetani*.

B. Satisfaz aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Proceder conforme descrito em *Características* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proceder conforme descrito em *Ensaio físico-químico* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Proceder conforme descrito em *Testes de segurança biológica* da monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

DOSEAMENTO

Com o ensaio de potência da amostra tem-se como objetivo determinar a dose neutralizante necessária para proteger os animais utilizados na prova contra os efeitos letais de uma dose teste da *Toxina tetânica de referência*. A dose do soro em teste é comparada com a dose da *Antitoxina tetânica de referência* necessária para conferir a mesma proteção.

Antitoxina tetânica de referência: o padrão de referência da antitoxina tetânica é uma preparação de soro equino hiperimune liofilizado, que especificamente neutraliza a toxina tetânica. O título nominal do padrão de referência secundário deve ser aferido, periodicamente, em unidades internacionais contra o padrão de referência internacional.

Toxina tetânica de referência: é preparada a partir de filtrados estéreis de sobrenadantes de cultivos líquidos de *C. tetani* incubados durante cinco a sete dias. O filtrado deve ser concentrado, purificado por métodos físicos ou químicos e liofilizado. Após a reconstituição, adicionar solução salina glicerinada e armazenar a -20 °C.

Determinação da dose teste de toxina (Lp/10): diluir a *Antitoxina tetânica de referência* para 1 UI/mL, com solução fisiológica a 0,85% (p/v). Diluir a toxina para uma determinada concentração, em solução fisiológica contendo peptona a 1% (p/v). Em uma série de tubos de ensaio, adicionar volumes variáveis de toxina e um volume constante da antitoxina de referência diluída. Igualar os volumes com o mesmo diluente da toxina. Homogeneizar e incubar a 37 °C por 60 minutos. Inocular

em cada camundongo albino suíço de 17 g a 22 g, por via subcutânea, com volume que contenha 0,1 UI de *Antitoxina tetânica de referência* em grupos de, no mínimo, 10 camundongos por mistura. Observar os animais até 96 horas após a inoculação e registrar o número de animais paralíticos por mistura. O *Lp/10* (limite paralisante por 10) ou dose teste da toxina é a menor quantidade de toxina que, quando combinada com 0,1 UI de *Antitoxina tetânica de referência*, provoca a paralisia dos animais no período de observação estipulado.

Determinação da potência do soro: diluir a *Toxina tetânica de referência* com solução fisiológica tamponada contendo peptona a 1% (p/v) para uma dose de 10 *Lp/10*. A uma série de tubos de ensaio, distribuir volumes variáveis da amostra. Adicionar 1 mL da *Toxina tetânica de referência* diluída e igualar os volumes para 2 mL com o mesmo diluente. Homogeneizar e incubar as misturas a 37 °C por 60 minutos. Inocular em cada camundongo albino suíço de 17 g a 22 g, por via subcutânea, um volume de 0,2 mL em grupos de, no mínimo, 10 camundongos por mistura. Observar os animais até 96 horas após a inoculação e registrar o número de animais paralíticos. Nas mesmas condições descritas e paralelamente, realizar a prova com a *Antitoxina tetânica de referência*, com o objetivo de verificar-se a validade da prova e estabelecer correlação no cálculo do título. Determinar as doses efetivas médias (DE_{50}) da amostra e da *Antitoxina tetânica de referência*, utilizando um método estatístico adequado. Para a determinação ser considerada válida é necessário que: (a) a faixa de resposta produzida (DE_{50}) esteja entre a maior e a menor diluição utilizada na amostra teste e padrão, formando a curva de regressão que deve apresentar uma relação linear; (b) os limites de confiança ($P = 0,95$) devem estar entre 50% e 200% da potência calculada. Calcular a potência do soro em teste, segundo a expressão:

$$\text{Potência} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{DE_{50} \text{ da amostra testada}}{DE_{50} \text{ da antitoxina de referência}} \times \frac{\text{UI}}{\text{mL}} \text{ da antitoxina de referência}$$

No mínimo 1000 UI/mL. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Alternativamente, pode ser utilizado um método *in vitro*, como ELISA ou ToBI (toxin-binding inhibition test), desde que sejam validados contra o teste de soroneutralização descrito.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumprir o estabelecido na monografia de *Soros hiperimunes para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-A PARA USO HUMANO

Immunoserum adversus A

DEFINIÇÃO

São preparações líquidas, estéreis, de cor azul artificial, límpidas, sem a presença de partículas em suspensão, contendo aglutininas específicas para o grupo sanguíneo “A” ou “A,B” (incluindo os subgrupos A1, A2, A1B e A2B), obtidas do plasma ou soro humano ou de cultura de célula (hibridoma). Devem possuir conservante antimicrobiano. Quando apresentadas em forma liofilizada, após a sua reconstituição, devem possuir as mesmas características físicas descritas para preparações líquidas. Não devem possuir contaminação por outros anticorpos reativos contra outros antígenos eritrocitários humanos, como o M^g, Wr^a e outros cuja frequência seja superior a 1% da população. Quando obtidas do fracionamento do plasma humano, esse deve apresentar altos títulos para esse anticorpo. Devem ser testadas com eritrócitos dos grupos “O” e “B” comprovando a sua não especificidade para esses grupos sanguíneos. Realizar teste de potência comparando o reagente com um soro de referência anti-A reconhecido, apresentando resultado equivalente ou superior quando testado numa mesma amostra de suspensão de hemácias do grupo sanguíneo A.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Inspeccionar visualmente durante o armazenamento e imediatamente antes do uso. Se a cor ou a aparência física for anormal ou se houver qualquer indício ou suspeita de contaminação microbiana, a unidade é imprópria para uso.

DOSEAMENTO

Testes laboratoriais. Testes laboratoriais devidamente validados são realizados de modo a garantir os parâmetros de qualidade discriminados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Parâmetros de qualidade para o soro reagente de tipagem sanguínea anti-A para uso humano.

Painel de hemácias	Intensidade de aglutinação (mínima)	Teste de avidéz	Título
A ₁	3+	Até 15 segundos	256
A ₂	2+	Até 30 segundos	128
A ₁ B	3+	Até 30 segundos	128
A ₂ B	2+	Até 45 segundos	64

EMBALAGEM

Frasco contendo 10 mL do soro reagente de tipagem sanguínea anti-A para uso humano, acompanhado de conta-gotas. Cada gota equivale a aproximadamente 50 µL.

ROTULAGEM

Observar legislação vigente. O rótulo das embalagens deve ter o fundo branco com letras de cor azul. Deve constar na bula que o soro foi testado para os vírus da hepatite B, hepatite C e HIV, porém nenhuma metodologia conhecida oferece segurança para os produtos derivados do sangue humano e que os cuidados de biossegurança devem ser respeitados. Quando obtido do plasma/soro humano, deve satisfazer às exigências da monografia *Plasma humano para fracionamento*. Além disso, o rótulo ou a bula devem conter, no mínimo, as seguintes recomendações:

- que a tipagem sanguínea deve ser realizada em tubo ou placa em U;
- que o prazo de validade depende da forma de apresentação do soro (forma líquida: até um ano se conservado entre 2 °C e 6 °C e até dois anos se conservado à temperatura ≤ -20 °C; forma liofilizada: até cinco anos e, depois de reconstituído, até um ano se conservado entre 2 °C e 6 °C).

SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-A,B PARA USO HUMANO

Immunoserum adversus A,B

DEFINIÇÃO

São preparações líquidas, estéreis, incolores, límpidas, sem a presença de partículas em suspensão, capazes de aglutinar eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “A”, “B” ou “A,B” (incluindo os subgrupos “A₁B” e “A₂B”), obtidas do plasma ou soro humano ou de cultura de célula (hibridoma). Devem possuir conservante antimicrobiano. Quando apresentadas em forma liofilizada, após a sua reconstituição, devem possuir as mesmas características físicas descritas para preparações líquidas. Não devem possuir contaminação por outros anticorpos reativos contra outros antígenos eritrocitários humanos, como o M^g, W^{r^a} e outros cuja frequência seja superior a 1% da população. Quando obtidas do fracionamento do plasma humano, esse deve apresentar altos títulos para este anticorpo. Devem ser testadas com eritrócitos do grupo “O” comprovando a sua não especificidade para esse grupo sanguíneo. Realizar teste de potência comparando o reagente com um soro de referência anti-A,B reconhecido, apresentando resultado equivalente ou superior quando testado numa mesma amostra de suspensão de hemácias do grupo sanguíneo A,B.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Inspeccionar visualmente durante o armazenamento e imediatamente antes do uso. Se a cor ou a aparência física for anormal ou se houver qualquer indício ou suspeita de contaminação microbiana, a unidade é imprópria para uso.

DOSEAMENTO

Testes laboratoriais. Testes laboratoriais devidamente validados são realizados de modo a garantir os parâmetros de qualidade discriminados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Parâmetros de qualidade para soro reagente de tipagem sanguínea anti-A,B para uso humano.

Painel de hemácias	Intensidade de aglutinação (mínima)	Teste de avidéz	Título
A ₁	3+	Até 15 segundos	256
A ₁ B	3+	Até 15 segundos	256
B	3+	Até 15 segundos	256
A ₂	3+	Até 30 segundos	128

EMBALAGEM

Frasco contendo 10 mL do soro reagente de tipagem sanguínea anti-A,B para uso humano, acompanhado de conta-gotas. Cada gota equivale a aproximadamente 50 µL.

ROTULAGEM

Observar legislação vigente. O rótulo das embalagens deve ter o fundo branco com letras de cor laranja. Deve constar na bula que o soro foi testado para os vírus da hepatite B, hepatite C e HIV, porém nenhum método conhecido oferece segurança para os produtos derivados do sangue humano e que os cuidados de biossegurança devem ser respeitados. Quando obtido do plasma/soro humano

deve satisfazer às exigências da monografia *Plasma humano para fracionamento*. Além disso, o rótulo ou a bula devem conter, no mínimo, as seguintes recomendações:

- que a tipagem sanguínea deve ser realizada em tubo ou placa em U;
- que o prazo de validade depende da forma de apresentação do soro (forma líquida: até um ano se conservado entre 2 °C e 6 °C e até dois anos se conservado à temperatura ≤ -20 °C; forma liofilizada: até cinco anos e, depois de reconstituído, até um ano se conservado entre 2 °C e 6 °C).

SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-B PARA USO HUMANO

Immunoserum adversus B

DEFINIÇÃO

São preparações líquidas, estéreis, de cor amarelo artificial, límpidas, sem a presença de partículas em suspensão, capazes de aglutinar eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “B” ou “A,B” (incluindo os subgrupos “A1B” e “A2B”), obtidas do plasma ou soro humano ou de cultura de célula (hibridoma). Devem possuir conservante antimicrobiano. Quando apresentadas em forma liofilizada, após a sua reconstituição, devem possuir as mesmas características físicas descritas para preparações líquidas. Não devem possuir contaminação por outros anticorpos reativos contra outros antígenos eritrocitários humanos, como o M^g, Wr^a e outros cuja frequência seja superior a 1% da população. Quando obtidas do fracionamento do plasma humano, este deve apresentar altos títulos para este anticorpo. Devem ser testadas com eritrócitos dos grupos “A” e “O” comprovando a sua não especificidade para estes grupos sanguíneos. Realizar teste de potência comparando o reagente com um soro de referência anti-B reconhecido, apresentando resultado equivalente ou superior quando testado numa mesma amostra de suspensão de hemácias do grupo sanguíneo B.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Inspeccionar visualmente durante o armazenamento e imediatamente antes do uso. Se a cor ou a aparência física for anormal ou se houver qualquer indício ou suspeita de contaminação microbiana, a unidade é imprópria para uso.

DOSEAMENTO

Testes laboratoriais. Testes laboratoriais devidamente validados são realizados de modo a garantir os parâmetros de qualidade discriminados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Parâmetros de qualidade para o soro reagente de tipagem sanguínea anti-B para uso humano.

Painel de hemácias	Intensidade de aglutinação (mínima)	Teste de avidéz	Título
B	3+	Até 15 segundos	256
A ₁ B	3+	Até 15 segundos	256

EMBALAGEM

Frasco contendo 10 mL do soro reagente de tipagem sanguínea anti-B para uso humano, acompanhado de conta-gotas. Cada gota equivale a aproximadamente 50 µL.

ROTULAGEM

Observar legislação vigente. O rótulo das embalagens deve ter o fundo branco com letras de cor amarela. Deve constar na bula que o soro foi testado para os vírus da hepatite B, hepatite C e HIV, porém nenhum método conhecido oferece segurança para os produtos derivados do sangue humano e que os cuidados de biossegurança devem ser respeitados. Quando obtido do plasma/soro humano deve satisfazer às exigências da monografia *Plasma humano para fracionamento*. Além disso, o rótulo ou a bula devem conter, no mínimo, as seguintes recomendações:

- que a tipagem sanguínea deve ser realizada em tubo ou placa em U;
- que o prazo de validade depende da forma de apresentação do soro (forma líquida: até um ano se conservado entre 2 °C e 6 °C e até dois anos se conservado à temperatura ≤ -20 °C; forma liofilizada: até cinco anos e, depois de reconstituído, até um ano se conservado entre 2 °C e 6 °C).

SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-RH (ANTI-D, ANTI-C, ANTI-E, ANTI-c, ANTI-e E ANTI-C^w) PARA USO HUMANO

Immunoserum adversus Rh

DEFINIÇÃO

São preparações líquidas, estéreis, incolores, límpidas, sem a presença de partículas em suspensão, aglutininas para antígenos do sistema ABO e aloanticorpos, obtidas do plasma ou soro humano ou a partir de cultura de célula (hibridoma). Devem possuir conservante antimicrobiano. Quando apresentadas em forma liofilizada, após a sua reconstituição, devem possuir as mesmas características físicas observadas nas preparações líquidas. Não devem ser adicionados corantes artificiais. Podem ser apresentadas na forma de imunoglobulina IgM em solução salina com baixa concentração proteica, na forma de IgG em solução com alta concentração proteica, na forma de misturas das imunoglobulinas IgG e IgM ou ainda a IgG modificada quimicamente.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Inspeccionar visualmente durante o armazenamento e imediatamente antes do uso. Se a cor ou a aparência física for anormal ou se houver qualquer indício ou suspeita de contaminação microbiana, a unidade é imprópria para uso.

DOSEAMENTO

Testes laboratoriais. Testes laboratoriais devidamente validados são realizados de modo a garantir os parâmetros de qualidade relacionados na **Tabela 1** e na **Tabela 2**.

Os principais soros para tipagem do sistema Rh estão listados na **Tabela 1**, cada um reagindo com o(s) antígeno(s) designado(s) pela letra correspondente (terminologia de Fisher-Race) e a nomenclatura alternativa (Weiner).

Tabela 1 – Terminologia segundo Fisher-Race e Weiner.

Antissoro	Antígeno	
	Fisher-Race	Weiner
Anti-D	D	Rh ₀
Anti-C	C	rh'
Anti-E	E	rh''
Anti-CD	D e C	Rh ₀ e rh'
Anti-DE	D e E	Rh ₀ e rh''
Anti-CDE	D, C e E	Rh ₀ , rh' e rh''
Anti-c	c	hr'
Anti-e	e	hr''
Anti-C ^w	C ^w	rh'w

Cada soro deve atender aos requisitos do teste para potência. No caso de soros salinos, para teste em tubos de ensaio, são feitos em paralelo com o soro padrão de referência anti-D, anti-C ou anti-E, não podendo os resultados serem inferiores ao padrão. Não há padrão de referência para o anti-c e anti-e em meio salino, devendo o teste de reatividade utilizar suspensão de hemácias de 3% a 5% com fenótipos conforme a **Tabela 2**.

No caso de soros, para uso em placa ou em tubo para teste rápido, são feitos em paralelo com o soro padrão de referência anti-D, anti-C, anti-E, anti-c ou anti-e, não podendo os resultados serem

inferiores ao padrão, devendo o teste de reatividade utilizar suspensão de hemácias de 3% a 5% com fenótipos conforme a **Tabela 2**.

O teste de avidéz para os soros reagentes, para uso em placa e tubo, atendem aos mesmos requisitos do teste de potência descrito nas monografias *Soro reagente de tipagem sanguínea anti-A para uso humano*, *Soro reagente de tipagem sanguínea anti-B para uso humano* e *Soro reagente de tipagem sanguínea anti-A,B para uso humano*.

Podem ser utilizadas hemácias do grupo A, B, AB ou O.

Tabela 2 - Relação entre anticorpos e fenótipos das células.

Soro	Fenótipo da célula
Anti-D	cDe
Anti-C	Ccde
Anti-E	cdEe
Anti-CD	cDe, Ccde
Anti-DE	cDe, cdEe
Anti-CDE	cdEe, cDe, Ccde
Anti-c	CcDEe
Anti-e	cdEe
Anti-C ^w	rh ^{w1}

O soro anti-D (anti-Rh(D) ou anti-Rho) deve apresentar reatividade de 3+, no mínimo com hemácias “O” R0r, “O” R1r e “O” R2r; avidéz de até 30 segundos e no máximo título 32. O soro anti-D em meio salino deve apresentar reatividade de 1+, no mínimo com hemácias “O” R0r, “O” R1r e “O” R2r; no máximo, título 8.

O soro anti-D não pode reagir com hemácias Rh negativas (rr), em temperatura ambiente e a 37 °C ou no teste indireto da antiglobulina humana (teste de Coombs indireto), sem potencializador. O soro tem que detectar D fraco. O soro controle deve possuir nas mesmas concentrações as substâncias utilizadas, inclusive as proteínas e conservantes, e não deve apresentar reação de aglutinação com as hemácias “O” R0r, R1r, R2r.

Cada soro deve atender aos requisitos dos ensaios de especificidade para o método mais sensível, recomendado pelo fabricante, em que devem ser testados com pelo menos quatro fenótipos positivos e quatro fenótipos negativos conforme **Tabela 3**. Deve ser demonstrada a ausência de contaminação de anticorpos reativos para os antígenos M^g e W^r^a, assim como outros antígenos que possuem incidência de 1% ou mais na população em geral.

Tabela 3 – Relação dos fenótipos a serem testados.

Soro	Células
Anti-D	CcDe, cDe, Ccde, cdEe, A ₁ cde, B cde, O cde, o teste deve ser realizado pela técnica de antiglobulina indireta, utilizando-se células de três diferentes doadores
Anti-C	cDe, Ccde, cdEe, C + rh _i neg. células, A ₁ cde, B cde, O cde
Anti-E	cDe, Ccde, cdEe, A ₁ cde, B cde, O cde
Anti-CD	cDe, Ccde, cdEe, A ₁ cde, B cde, O cde, e onde recomendado para a detecção do antígeno G, r ^G r
Anti-DE	cDe, Ccde, cdEe, A ₁ cde, B cde, O cde
Anti-CDE	cDe, Ccde, cdEe, A ₁ cde, B cde, O cde, e onde recomendado para a detecção do antígeno G, r ^G r

Anti-c	Ccde, A ₁ CDe, B CDe, O CDe, e CDEe ou CDE ou CdE
Anti-e	cdEe, A ₁ cDE, B cDE, O cDE, e CcDE ou CDE ou CdE
Anti-C ^w	rh ^{w1} , A ₁ rh ^{w1} , B rh ^{w1} e O CDe, e CDEe

Todos os glóbulos vermelhos em suspensão usados para estes procedimentos devem ser validados e seus registros mantidos.

Antígenos com maior incidência na população brasileira são os seguintes: A, B, H, Le^a, Le^b, I, K, k, Kp^a, Kp^B, Ic^C, P1, D, C, E, c, e, C^w, M, N, S, s, U, Lu^a, Lu^b, Jk^A, Jk^b, Fy^a, Fy^b, Di^a e Di^B.

São também conhecidos Ga, Do^a, Do^b, Yt^a, Yt^B, Lan, Co^a, Co^b, M^g, Wr^a e Sd^a.

EMBALAGEM

Frasco contendo 10 mL do soro reagente de tipagem sanguínea para uso humano específico acompanhado de conta-gotas. Cada gota equivale a aproximadamente 50 µL.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente. O rótulo ou a bula devem conter, no mínimo, as seguintes recomendações:

- que a tipagem sanguínea deve ser realizada em tubo ou placa em U;
- que o prazo de validade depende da forma de apresentação do soro (forma líquida: até um ano se conservado entre 2 °C e 6 °C e até dois anos se conservado a temperatura ≤ -20 °C; forma liofilizada: até cinco anos e, depois de reconstituído, até um ano se conservado entre 2 °C e 6 °C).

SOROS HIPERIMUNES PARA USO HUMANO

Immunosera adusum humanum

Os soros hiperimunes são preparações contendo imunoglobulinas purificadas, de origem animal, que neutralizam especificamente toxinas bacterianas, bactérias, vírus ou componentes tóxicos do veneno de uma ou mais espécies de animais peçonhentos. Um conservante adequado pode ser adicionado e o produto final é apresentado sob forma líquida ou pó liofilizado. O produto líquido é límpido, incolor ou ligeiramente amarelado, não apresentando grumos ou partículas. O soro liofilizado consiste de pó branco ou ligeiramente amarelado que, uma vez reconstituído, apresenta as mesmas características das preparações líquidas.

As imunoglobulinas purificadas são obtidas por tratamento enzimático e precipitação fracionada, ou por outros procedimentos químicos ou físicos, de plasmas de animais sadios imunizados com os antígenos específicos. Durante o processo de imunização, os animais não devem ser tratados com penicilina ou estreptomicina.

Para assegurar a qualidade do produto nas diversas fases de processamento devem ser realizados testes de esterilidade, pH, proteínas, atividade ou potência, por métodos *in vitro*, preferencialmente, ou métodos *in vivo*, quando cabível.

Antes do envase, amostras do produto são submetidas às determinações que se seguem.

Cloreto de sódio. 0,70% (p/v) a 0,90% (p/v).

Fenol. No máximo 0,35% (p/v).

Nitrogênio e proteínas. No máximo 0,30% (p/v) de nitrogênio não proteico. No máximo 15% (p/v) de proteínas.

Potência. É determinada de acordo com os procedimentos indicados nas monografias respectivas.

Sólidos totais. No máximo 20%.

Sulfato de amônio. No máximo 0,20% (p/v). A preparação é distribuída asépticamente em ampolas ou frascos-ampola. A liofilização do produto, quando requerida, deve assegurar concentração de água não superior a 3% do produto final.

IDENTIFICAÇÃO

A. Baseada na reação *in vitro* de antígeno-anticorpo por *Imunodifusão duplo radial (Ouchterlony)*. Preparar gel de ágar a 1% (p/v) e distribuir em lâmina para microscópio, de modo que resulte em camada fina. Colocar em estufa a 37 °C, sem secar. Adicionar 4 mL de ágar na lâmina e colocar à temperatura de 2 °C a 8 °C em câmara úmida por uma hora. Fazer orifícios no gel, mantendo a mesma distância entre o orifício central e os periféricos. Preencher o orifício central com solução do antígeno específico e os periféricos com a amostra a testar, em diluições variáveis. Preencher um dos orifícios com soro normal equino, para controle negativo. Incubar a 37 °C por 24 horas em câmara úmida e realizar a leitura em lâmpada para contraste. Observar a presença de linha de precipitação, reação de identidade entre os componentes analisados.

B. Atende aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

pH (5.2.19). 6,0 a 7,0.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Cloreto de sódio. Em erlenmeyer de 50 mL, adicionar 10 mL da amostra diluída a 10% (v/v) em água bidestilada. Adicionar, com agitação, três gotas de difenilcarbazona-azul de bromofenol SR e, posteriormente, algumas gotas de ácido nítrico 0,20 M SV, até que a solução fique amarelo-esverdeada. Efetuar ensaio em branco. Titular com nitrato de mercúrio (II) 0,01 M SV, até o ponto de viragem, em que uma coloração violeta indica o ponto final. Cada mL de nitrato de mercúrio (II) 0,01 M SV equivale a 0,585 mg de cloreto de sódio. É facultado ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase. Entre 0,70% (p/v) e 0,90% (p/v).

Fenol. No máximo 0,35% (p/v).

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Diluir a amostra, de modo que a concentração de fenol esteja entre 5 ppm e 30 ppm. Adicionar 5 mL de tampão borato pH 9,0, 5 mL de 4-aminoantipirina a 0,10% (p/v) e 5 mL de ferricianeto de potássio a 5% (p/v). Em paralelo, preparar branco e uma curva de calibração de fenol com concentrações variando de 5 ppm a 30 ppm. Proceder às leituras das absorvâncias (5.2.14) da amostra, dos padrões e do branco a um comprimento de onda de 546 nm, 10 minutos após o término da reação. Utilizar a leitura dos padrões para fazer a curva analítica e determinar a concentração de fenol na amostra por interpolação gráfica ou regressão linear. É facultado ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

B. Adicionar 1 mL da amostra em um balão volumétrico e completar o volume para 200 mL com água destilada. Dessa solução, tomar 5 mL e transferir para um balão volumétrico de 25 mL. Adicionar 3 mL de tampão borato pH 9,0, 2,5 mL 4-aminoantipirina a 0,15% (p/v) e 0,5 mL de ferricianeto de potássio a 5% (p/v). Agitar e completar o volume com água destilada. Em paralelo, preparar o branco e uma curva de calibração de fenol com concentrações variando de 0,6 µg a 3,9 µg de fenol por mililitro. Proceder às leituras das absorvâncias (5.2.14) da amostra, dos padrões e do branco, em comprimento de onda de 495 nm, de 20 a 40 minutos após o término da reação. Utilizar a leitura dos padrões para fazer a curva analítica e determinar a concentração de fenol na amostra, por interpolação gráfica ou regressão linear.

Nitrogênio proteico e proteínas. Proceder conforme descrito em *Determinação de nitrogênio pelo método Kjeldahl (5.3.3.2)*. No máximo 0,3% (p/v) de nitrogênio não proteico e 15% (p/v) de proteínas. Para determinar a concentração de proteínas, multiplicar o resultado de nitrogênio proteico por 6,25. É facultado ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Sólidos totais. Em pesa-filtro previamente tarado, pesar com exatidão 1 g da amostra, em duplicata, e colocar na capela de exaustão sobre placa de aquecimento, até a evaporação do líquido. Transferir o pesa-filtro com a amostra para estufa a 105 °C e deixar por uma hora. Transferir a amostradessecada para dessecador, deixar por 30 minutos e pesar. Repetir o procedimento de dessecação até peso constante. Calcular a porcentagem de sólidos totais segundo a expressão:

$$\% \text{ de sólidos totais} = B \times 100 C$$

em que,

B = diferença entre o pesa-filtro dessecado e o pesa-filtro vazio; C = peso da amostra.

É facultado ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase. No máximo, 20%.

Sulfato de amônio. Diluir a amostra a 1% (v/v) com água purificada e transferir 10 mL da solução para tubo de Nessler. Transferir 1 mL de solução estoque de sulfato de amônio a 0,6% (p/v) para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água purificada. Diluir a solução em proporções 1:2, 1:3, 1:4 e transferir 10 mL de cada diluição para três tubos de Nessler. Adicionar 1 mL de reagente de Nessler a cada um dos tubos contendo a amostra e os padrões e comparar a cor. A intensidade da cor da amostra é igual ou menor que a da solução padrão diluída a 1:3. É facultado ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase. No máximo 0,2% (p/v).

Umidade residual. É determinada quando o produto é apresentado sob a forma liofilizada. Transferir 80 mg da amostra para um pesa-filtro previamente dessecado e tarado. Manter por três horas em atmosfera de pentóxido de fósforo anidro, sob pressão não superior a 5 mm de mercúrio, à temperatura de 60 °C. O pesa-filtro contendo a amostra é resfriado por 20 minutos em dessecador contendo sílica-gel e pesado imediatamente. A etapa de aquecimento e resfriamento é repetida até a obtenção de peso constante. O valor da umidade residual é a média do porcentual de perda de peso de três avaliações da amostra, no mínimo. O método volumétrico para determinação de água (**5.2.20.1**) também pode ser utilizado. No máximo 3%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste. Utilizar somente o método de filtração por membrana, que deve ter porosidade nominal máxima de 0,45 µm.

Pirogênios (5.5.2.7). Cumpre o teste. Caso não seja possível o emprego do MAT (**5.5.2.7.1**), o teste de pirogênios em coelhos (**5.5.2.7.2**) poderá ser empregado. Nesse caso, injetar 1 mL/kg e não reutilizar os animais utilizados no teste. O teste de endotoxinas bacterianas (**5.5.2.7.3**) poderá substituir o teste de pirogênios totais, acompanhado de uma análise de risco produto-específica para evidenciar o baixo risco de presença de pirogênios não-endotoxina (NEPs) na amostra e a correlação de resultados obtidos por meio dos dois métodos.

DOSEAMENTO

Para a determinação da potência, proceder conforme descrito na monografia específica. É facultado ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

A temperatura e o prazo de validade são os indicados pelo fabricante do soro, tendo como base evidências experimentais, aprovadas pela autoridade de controle regulatório nacional.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

TINZAPARINA SÓDICA

Tinzaparinum natricum

A tinzaparina sódica é um sal sódico de heparina de baixo peso molecular obtida por despolimerização enzimática controlada da heparina de mucosa intestinal suína, utilizando-se a heparinase de *Flavobacterium heparinum*. A maioria dos componentes possuem uma estrutura do ácido 2-O-sulfo-4-enepiranosurônico na região da extremidade não redutora e uma 2N,6-O-disulfo-D-glucosamina na região da extremidade redutora da cadeia.

A tinzaparina sódica deve estar em conformidade com a monografia *Heparina de baixo peso molecular* com as modificações e exigências adicionais descritas a seguir.

A massa molecular média relativa varia de 5500 Da a 7500 Da, com um valor característico próximo de 6500 Da. O grau de sulfatação é de 1,8 a 2,5 por unidade dissacarídica. A potência não deve ser inferior a 70 UI nem superior a 120 UI de atividade antifator Xa por miligrama, calculado em relação à substância dessecada. A razão da atividade antifator Xa pela a atividade antifator IIa é entre 1,5 e 2,5.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no teste **A.** de *Identificação* da monografia *Heparina de baixo peso molecular*, utilizar tinzaparina sódica padrão.

B. Proceder conforme descrito no teste **B.** de *Identificação* da monografia *Heparina de baixo peso molecular*. O espectro obtido deve ser similar ao da tinzaparina padrão.

C. Proceder conforme descrito no teste **C.** de *Identificação* da monografia *Heparina de baixo peso molecular*. Os seguintes requisitos se aplicam: a massa molecular média relativa varia de 5500 Da a 7500 Da; a porcentagem em massa das cadeias inferiores a 2000 Da é, no máximo, 10%; a porcentagem de cadeias com peso molecular entre 2000 Da e 8000 Da pode variar, no máximo, entre 60% e 72%; a porcentagem de cadeias com peso molecular acima de 8000 Da pode variar de 22% a 36%.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto da preparação. Dissolver 1 g da amostra em 10 mL de água. A preparação é límpida (5.2.25).

ENSAIOS DE PUREZA

Absorvância específica. 8,0 a 12,5 em relação à substância dessecada, determinada a 231 nm. Dissolver 50 mg da amostra em 100 mL de ácido clorídrico 0,01 M.

TOXOIDE TETÂNICO ADSORVIDO

Toxoidum tetanicum adsorbatum

O toxoide tetânico é anatoxina tetânica diluída em solução salina tamponada e adsorvida pelo hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, podendo conter um conservante. É uma suspensão opalescente, ligeiramente acastanhada, que não apresenta grumos ou partículas estranhas.

A preparação da toxina tetânica baseia-se no sistema de lote semente, que é uma quantidade de ampolas contendo *Clostridium tetani* liofilizado, de composição uniforme, obtido a partir de uma cepa liofilizada de procedência conhecida. Os meios de cultura utilizados para as preparações do lote-semente e do inóculo de produção devem possibilitar o crescimento de *C. tetani*. O meio de cultura para preparação da toxina tetânica deve ser isento de substâncias capazes de induzir reações tóxicas e/ou alérgicas ao ser humano. A toxina tetânica é um filtrado tóxico obtido a partir do cultivo de *C. tetani* em meio de cultura para preparação de toxina e coletado assepticamente em um único processo. Ao final do cultivo e lise das células bacterianas, verifica-se a pureza da cultura por exame microscópico ou inoculação da amostra em meios de cultura adequados. O limite de floculação (Lf/mL) é avaliado, utilizando a técnica de Ramon.

Limite de floculação – Técnica de Ramon. Distribuir em tubos de ensaio volumes variáveis de antitoxina tetânica padronizada. Adicionar em cada tubo um volume constante de 1 mL da amostra. Homogeneizar e colocar em banho-maria à temperatura de 45 °C a 50 °C. Observar constantemente e anotar o primeiro tubo que apresenta floculação e o tempo necessário. Determinar o Lf/mL da amostra, multiplicando o volume de antitoxina de referência adicionada ao tubo pela sua concentração em Lf.

A toxina é purificada por métodos físicos ou químicos e submetida aos controles de Lf/mL e pH.

A anatoxina tetânica é obtida por destoxificação da toxina tetânica concentrada, pela adição de agentes químicos em condições adequadas de pH e temperatura. O agente químico mais utilizado é o formaldeído à temperatura de 35 °C. São realizados controles de pH, Lf/mL e toxicidade específica.

Toxicidade específica. Não diluir a anatoxina se não estiver concentrada. Diluir a amostra em solução fisiológica para 100 Lf/mL. Inocular 5 mL da diluição, por via subcutânea, em cada uma de pelo menos cinco cobaias de 250 g a 350 g. Observar os animais por quatro semanas. No mínimo 80% dos animais inoculados têm que sobreviver durante o período de observação, sem apresentar sinais de intoxicação tetânica. Se mais de um animal morrer de causa não específica durante o período de teste, o teste pode ser repetido mais uma vez. Se mais de um animal morrer no segundo teste, a amostra não cumpre com o teste.

A anatoxina purificada é preparada a partir de uma coleta individual ou da mistura de coletas individuais de anatoxina e, após processo de filtração esterilizante, um agente conservante pode ser adicionado. Não é permitido o uso de fenol, pois ele afeta as propriedades antigênicas do produto. A anatoxina purificada é avaliada quanto à concentração de antígeno (Lf/mL), esterilidade e aos testes que se seguem.

Formaldeído residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm.

Timerosal. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm.

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

Atividade imunogênica. Proceder conforme descrito em *Determinação da atividade imunogênica*. No mínimo 2 UI/mL ou 40 UI/dose individual humana, conforme o método utilizado.

Toxicidade específica. Proceder conforme descrito anteriormente para anatoxina tetânica, sendo que a amostra é diluída para 500 Lf/mL e cada cobaia é inoculada com volume de 1 mL.

Pureza antigênica. Determinar o teor de nitrogênio proteico (5.3.3.2) e expressar a concentração em mg/mL. A pureza antigênica é determinada pela relação da concentração antigênica em Lf/mL e a concentração de nitrogênio proteico encontrada. O produto possui pureza antigênica de, no mínimo, 1000 Lf/mg de nitrogênio proteico.

Reversão de toxicidade. Diluir a amostra para 25 Lf/mL em solução fisiológica e distribuir em dois frascos. Manter um dos frascos à temperatura de 4 °C a 8 °C e o outro entre 35 °C e 37 °C, por seis semanas. Ao término das seis semanas, inocular o conteúdo de cada frasco, por via subcutânea, em cinco cobaias de 250 g a 350 g, sendo o volume do inóculo de 5 mL por animal. Os animais não podem apresentar sinais de intoxicação tetânica. Se mais de um animal morrer de causa não específica durante o período de teste, o teste pode ser repetido mais uma vez. Se mais de um animal morrer no segundo teste, a amostra não cumpre com o teste.

O toxoide tetânico é preparado pela diluição e adsorção, em compostos de alumínio, de determinada quantidade de anatoxina. Uma dose para uso humano contém, no máximo, 25 Lf. Antes do envase, amostras do produto são submetidas aos controles de esterilidade, atividade imunogênica, pH, formaldeído residual, timerosal e alumínio.

O produto é envasado em recipientes adequados, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

A. Adicionar citrato de sódio à amostra da vacina até que se obtenha uma concentração de 5% a 10% de citrato de sódio. Manter a 37 °C por, aproximadamente, 16 horas e centrifugar. Utilizar o líquido sobrenadante para a identificação. Outros métodos adequados podem ser utilizados para separação do adjuvante. Preparar gel de ágar a 1% (p/v) em solução fisiológica tamponada e distribuir em lâmina para microscópio, de modo que resulte em fina camada. Colocar em estufa a 37 °C, sem secar. Adicionar volume de 4 mL de ágar na lâmina e colocar à temperatura de 2 °C a 8 °C em câmara úmida por uma hora. Fazer orifícios no gel, mantendo a mesma distância entre o orifício central e os periféricos. Preencher o orifício central com antitoxina tetânica de referência e os periféricos com a amostra em diluições variáveis. Como controle positivo, preencher um dos orifícios com toxoide tetânico fluido. Incubar a 37 °C por 24 horas em câmara úmida e realizar a leitura em lâmpada para contraste. Observar a presença de linha de precipitação, reação de identidade entre os componentes analisados.

B. Determinar o limite de floculação (Lf/mL) pela técnica de Ramon.

C. A *Determinação da atividade imunogênica* pode ser utilizada.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra da vacina. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Alumínio. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 1,25 mg/dose individual humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Formaldeído residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Timerosal. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOGÊNICA

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Por Determinação do título antitóxico em soros de animais imunizados

Imunização e sangria dos animais: inocular 0,75 mL (metade da dose total humana) da amostra, por via subcutânea, em cada uma de seis cobaias de 450 g a 550 g. Seis semanas após a inoculação, coletar sangue de cada animal e extrair o soro. Misturar volumes iguais dos soros de, no mínimo, quatro cobaias.

Controle de limite paralisante (Lp) da toxina tetânica padronizada: distribuir em uma série de tubos de ensaio, volumes constantes de antitoxina tetânica de referência, aferida por padrão internacional, de maneira que o volume a inocular contenha 0,1 UI. Acrescentar volumes variáveis de toxina tetânica padronizada e igualar os volumes de todos os tubos com solução salina tamponada contendo 1% (p/v) de peptona. Homogeneizar e incubar a 37 °C por 60 minutos. Inocular um volume constante de cada diluição, por via subcutânea, em dez camundongos albinos suíços pesando entre 17 g e 22 g. Observar os animais quanto aos sintomas de paralisia pelo período de 96 horas após a inoculação. Calcular a dose paralisante 50% (Lp/10/50) por método estatístico adequado.

Titulação do soro: distribuir, em uma série de tubos de ensaio, volumes variáveis do soro da amostra e do soro de referência. Acrescentar volume constante de toxina tetânica padronizada, de maneira que o volume a inocular por animal contenha 1 Lp/10/50. Igualar os volumes de todos os tubos com solução salina tamponada contendo 1% (p/v) de peptona. Homogeneizar e incubar a 37 °C por 60 minutos. Inocular cada mistura, por via subcutânea, em no mínimo seis camundongos albinos suíços pesando entre 17 g e 22 g. Observar os animais por um período de 96 horas após a inoculação e registrar o número de animais não paralíticos em cada mistura. Os valores das doses efetivas médias (DE50) da amostra e da antitoxina de referência são determinados, utilizando método estatístico adequado. Os limites de confiança (P = 0,95) devem estar compreendidos entre 50% e 200% da potência estimada e a análise estatística deve mostrar linearidade e paralelismo das curvas dose resposta. Calcular a atividade imunogênica pela equação:

$$AI = \frac{A}{B} \times C$$

em que,

AI = atividade imunogênica em UI/mL;

A = DE₅₀ da antitoxina de referência;

B = DE₅₀ da amostra;

C = UI/mL da antitoxina de referência.

No mínimo 2 UI/mL de soro. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Pode ser utilizado um método *in vitro*, como ensaio imunoenzimático ou ToBI (*toxin-binding inhibition test*), desde que sejam validados contra o teste de soroneutralização descrito.

B. Por Desafio em camundongos. Essa determinação comprova a atividade imunogênica do produto, por comparação com um toxoide tetânico de referência aferido por um padrão internacional. Separar nove grupos de, no mínimo, 20 camundongos de 11 g a 14 g para a realização do ensaio e um grupo de 12 animais, sem inocular, para controle da toxina de desafio. Efetuar quatro diluições da amostra com solução fisiológica, utilizando um fator de diluição 2. Proceder da mesma forma com o toxoide tetânico de referência. Imunizar, por via subcutânea, com um volume de 0,5 mL de cada diluição da amostra por animal. Vinte e oito dias após a imunização, diluir a toxina tetânica padronizada em solução salina tamponada contendo 1% (p/v) de peptona, de modo a conter 200 Dp₅₀/mL (dose paralisante média) e inocular cada camundongo imunizado, por via subcutânea, com um volume de 0,5 mL da dose desafio de toxina padronizada. Observar os animais até 96 horas após a inoculação e registrar o número de vivos e sem paralisia em cada diluição. Paralelamente, como controle da dose desafio, efetuar diluições 1:50, 1:100 e 1:200 a partir da solução de toxina que contém 200 Dp₅₀/mL, utilizando o mesmo diluente. Inocular 0,5 mL de cada diluição, por via subcutânea, no grupo de 12 animais separados, divididos em grupo de quatro animais. Observar os animais até 96 horas após a inoculação e registrar o número de mortos e paralíticos em cada diluição. Todos os animais de controle do desafio, inoculados com a diluição 1:50, devem morrer ou apresentar paralisia e nenhum dos animais inoculados com a diluição 1:200 deve morrer ou apresentar paralisia. Calcular as doses efetivas médias (DE₅₀) da amostra em teste e do toxoide de referência, utilizando um método de análise estatístico adequado. A faixa de resposta produzida (porcentagem de sobrevivência) deve estar entre a maior e a menor diluição utilizada na amostra teste e padrão, os limites de confiança (P = 0,95) devem estar compreendidos entre 50% e 200% da potência estimada e a análise estatística deve mostrar linearidade e paralelismo das curvas dose resposta. Calcular a atividade imunogênica pela equação:

$$AI = \frac{A}{B} \times C$$

em que,

AI = atividade imunogênica em UI/dose individual humana;

A = DE₅₀ do toxoide de referência;

B = DE₅₀ da amostra;

C = UI/dose individual humana do toxoide de referência.

No mínimo 40 UI/dose individual humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

C. Por Desafio em cobaias. Essa determinação comprova a atividade imunogênica do produto, por comparação com um toxoide tetânico de referência aferido por um padrão internacional. Separar oito grupos de, no mínimo, 16 cobaias de 250 g a 350 g para a realização do ensaio e um grupo de 12 animais, sem inocular, para controle da toxina de desafio. Efetuar quatro diluições da amostra com

solução fisiológica, utilizando um fator de diluição 2. Proceder da mesma forma com o toxoide tetânico de referência. Imunizar, por via subcutânea, com um volume de 1 mL de cada diluição da amostra por animal. Após 28 dias da imunização, diluir a toxina tetânica padronizada em solução salina tamponada contendo 1% (p/v) de peptona, de modo a conter 100 DL₅₀/mL e inocular cada cobaia imunizada, por via subcutânea, com um volume de 1 mL da dose desafio de toxina padronizada. Observar os animais até 96 horas após a inoculação e registrar o número de vivos em cada diluição. Paralelamente, como controle da dose desafio, efetuar diluições 1:50, 1:100 e 1:200 a partir da solução de toxina que contém 100 DL₅₀/mL, utilizando o mesmo diluente. Inocular 1 mL de cada diluição, por via subcutânea, no grupo de 12 animais separados, divididos em grupo de quatro animais. Observar os animais até 96 horas após a inoculação e registrar o número de mortos em cada diluição. Todos os animais de controle do desafio inoculados com a diluição 1:50 devem morrer e nenhum dos animais inoculados com a diluição 1:200 deve morrer. Calcular as doses efetivas médias (DE₅₀) da amostra e do toxoide de referência, utilizando um método de análise estatístico adequado. A faixa de resposta produzida (porcentagem de sobrevivência) deve estar entre a maior e a menor diluição utilizada na amostra teste e padrão, os limites de confiança (P=0,95) devem estar compreendidos entre 50% e 200% da potência estimada e a análise estatística deve mostrar linearidade e paralelismo das curvas dose resposta. Calcular a atividade imunogênica pela equação:

$$AI = \frac{A}{B} \times C$$

em que,

AI = atividade imunogênica em UI/dose individual humana;

A = DE₅₀ do toxoide de referência;

B = DE₅₀ da amostra;

C = UI/dose individual humana do toxoide de referência.

No mínimo 40 UI/dose individual humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra com o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA ADSORVIDA DIFTERIA E TÉTANO ADULTO

Vaccinum diphtheriae et tetani adsorbatum

vacina adsorvida difteria e tétano adulto; 09039

A vacina é uma mistura de anatoxinas diftérica e tetânica, diluídas em solução salina tamponada e adsorvidas pelo hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, podendo conter um conservante. É uma suspensão opalescente, ligeiramente acastanhada, que não apresenta grumos ou partículas estranhas.

Componente diftérico: a anatoxina diftérica purificada cumpre as especificações de produção e controles descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

Componente tetânico: a anatoxina tetânica purificada cumpre as especificações de produção e controles descritos na monografia de *Toxoide tetânico adsorvido*.

A vacina é preparada pela diluição e adsorção, em compostos de alumínio, de quantidades determinadas de anatoxina diftérica e anatoxina tetânica purificadas. Uma dose para uso humano deve conter no máximo 2,5 Lf para o componente diftérico e 25 Lf para o componente tetânico. Antes do envase, amostras do produto são submetidas aos controles de esterilidade, atividade imunogênica, pH, formaldeído residual, timerosal e alumínio.

O produto é envasado em recipientes adequados, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

Cumpra a *Identificação* descrita na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra da vacina. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

Determinação de volume (5.1.2). Cumpra o teste.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Alumínio. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 1,25 mg/dose individual humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Formaldeído residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Timerosal. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

DOSEAMENTO

A atividade imunogênica da vacina é determinada para cada um dos componentes individuais. Não existem padrões internacionais de referência para as vacinas combinadas e a atividade de cada componente se expressa em unidades internacionais, mediante a comparação de padrões de referência calibrados com padrões de referência dos componentes individuais.

Componente diftérico. Proceder conforme *Doseamento*, utilizando um dos métodos descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

A. No mínimo 0,5 UI/mL.

B. No mínimo 2 UI/dose individual humana.

É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente tetânico. Proceder conforme *Doseamento*, utilizando um dos métodos descritos na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*.

A. No mínimo 2 UI/mL.

B. No mínimo 40 UI/dose individual humana.

C. No mínimo 40 UI/dose individual humana.

É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumprir o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA ADSORVIDA DIFTERIA E TÉTANO INFANTIL

Vaccinum diphtheriae et tetani adsorbatum

vacina adsorvida difteria e tétano infantil; 09988

A vacina é uma mistura de anatoxinas diftérica e tetânica, diluídas em solução salina tamponada e adsorvidas pelo hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, podendo conter um conservante. É uma suspensão opalescente, ligeiramente acastanhada, em que não há grumos ou partículas estranhas.

Componente diftérico: a preparação da toxina diftérica baseia-se no sistema de lote-semente, que é uma quantidade de ampolas contendo *Corynebacterium diphtheriae* liofilizado, de composição uniforme, obtido a partir de cepa liofilizada de procedência conhecida. Os meios de cultura utilizados para as preparações do lote-semente e do inóculo de produção devem possibilitar o crescimento de *C. diphtheriae*. O meio de cultura para preparação da toxina diftérica deve ser isento de substâncias capazes de induzir reações tóxicas e/ou alérgicas ao ser humano. Ao final do cultivo e lise das células bacterianas, verifica-se a pureza da cultura por exame microscópico ou inoculação da amostra em meios de cultura adequados. A toxina diftérica é um filtrado tóxico obtido a partir do cultivo de *C. diphtheriae* em meio de cultura para produção de toxina e coletado asépticamente em um único processo. O limite de floculação (Lf) é avaliado utilizando a técnica de Ramon, como descrito na monografia de *Toxoide tetânico adsorvido*. A purificação da toxina é realizada por métodos físicos ou químicos e a amostra é submetida aos controles de Lf/mL e pH.

A anatoxina diftérica é obtida por destoxificação da toxina diftérica concentrada, pela adição de agentes químicos em condições adequadas de pH e temperatura. O agente químico mais utilizado é o formaldeído à temperatura de 35 °C. São realizados controles de pH, Lf/mL e toxicidade específica.

Toxicidade específica

Prova subcutânea: diluir a amostra em solução fisiológica para 100 Lf/mL. Inocular 5 mL da diluição, por via subcutânea, em cada uma de pelo menos cinco cobaias de 250 g a 350 g. Observar os animais por quatro semanas. No mínimo 80% dos animais inoculados devem sobreviver durante o período de observação, sem apresentar sinais de intoxicação diftérica. Se mais de um animal morrer de causa não específica durante o período de teste, o teste pode ser repetido mais uma vez. Se mais de um animal morrer no segundo teste, a amostra não cumpre com o teste.

Prova intradérmica: diluir a amostra em solução fisiológica para 100 Lf/mL. Inocular 0,2 mL da diluição, por via intradérmica, em uma cobaia previamente depilada. Como controle, inocular o mesmo volume de solução fisiológica no mesmo animal. Após 48 horas de observação, não devem ser formados eritemas específicos nos locais de inoculação.

A anatoxina purificada é preparada a partir de coleta individual ou da mistura de coletas individuais de anatoxinas que, após processo de filtração esterilizante, um agente conservante pode ser adicionado. Não é permitido o uso de fenol, pois ele afeta as propriedades antigênicas do produto. Amostras do produto são avaliadas quanto à concentração de antígeno (Lf/mL), esterilidade e aos controles que se seguem.

Formaldeído residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm.

Timerosal. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm.

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

Atividade imunogênica. Proceder conforme descrito em *Determinação da atividade imunogênica*. No mínimo 2 UI/mL ou 30 UI/dose individual humana, conforme o método utilizado.

Toxicidade específica. Proceder à prova subcutânea conforme descrito anteriormente para anatoxina diftérica, sendo que a amostra é diluída para 500 Lf/mL e cada cobaia é inoculada com volume de 1 mL.

Pureza antigênica. Determinar o teor de nitrogênio proteico (5.3.3.2) e expressar a concentração em mg/mL. A pureza antigênica é determinada pela relação da concentração antigênica em Lf/mL e a concentração de nitrogênio proteico encontrada. O produto possui pureza antigênica de, no mínimo, 1500 Lf/mg de nitrogênio proteico.

Reversão de toxicidade. Proceder conforme descrito na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*. Os animais não podem apresentar sinais de intoxicação diftérica e devem apresentar ganho de peso.

Componente tetânico: a anatoxina tetânica cumpre as especificações de produção e controles descritos na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*.

A vacina adsorvida difteria e tétano infantil é preparada pela diluição e adsorção, em compostos de alumínio, de quantidades determinadas de anatoxinas diftérica e tetânica. Uma dose para uso humano contém, no máximo, 30 Lf e 25 Lf para os componentes diftérico e tetânico, respectivamente. Antes do envase, amostras do produto são submetidas aos controles de esterilidade, atividade imunogênica, pH, formaldeído residual, timerosal e alumínio.

O produto é envasado em recipientes adequados, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

Componente diftérico

A. Adicionar citrato de sódio à amostra da vacina até que se obtenha uma concentração de 5% a 10% de citrato de sódio. Manter a 37 °C por aproximadamente 16 horas e centrifugar. Utilizar o líquido sobrenadante para a identificação. Outros métodos adequados podem ser utilizados para separação do adjuvante. Preparar gel de ágar a 1% (p/v) em solução fisiológica tamponada e distribuir em lâmina para microscópio, de modo que resulte em fina camada. Colocar em estufa a 37 °C, sem secar. Adicionar volume de 4 mL de ágar na lâmina e colocar à temperatura de 2 °C a 8 °C em câmara úmida por uma hora. Fazer orifícios no gel, mantendo a mesma distância entre o orifício central e os periféricos. Preencher o orifício central com antitoxina diftérica de referência e os periféricos com a amostra em diluições variáveis. Como controle positivo, preencher um dos orifícios com toxóide diftérico fluido. Incubar a 37 °C por 24 horas em câmara úmida e realizar a leitura em lâmpada para contraste. Observar a presença de linha de precipitação, reação de identidade entre os componentes analisados.

B. Determinar o limite de floculação (Lf/mL) pela técnica de Ramon, conforme descrito na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*.

C. A *Determinação da atividade imunogênica* pode ser utilizada.

Componente tetânico. Proceder conforme descrito em *Identificação* na monografia de *Toxoide tetânico adsorvido*.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Alumínio. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 1,25 mg/dose individual humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Formaldeído residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Timerosal. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOGÊNICA

A atividade imunogênica da vacina é determinada para cada um dos componentes. Não existem padrões internacionais de referência para as vacinas combinadas e a atividade de cada componente se expressa em unidades internacionais, mediante a comparação com padrões de referência calibrados contra os padrões de referência dos componentes.

Componente diftérico

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Por *Determinação do título antitóxico em soros de animais imunizados.*

Imunização e sangria dos animais: inocular 0,75 mL (metade da dose total humana) da amostra, por via subcutânea, em cada uma de seis cobaias de 450 g a 550 g. Quatro semanas após a inoculação, coletar sangue de cada animal, por punção cardíaca, e extrair o soro. Misturar volumes iguais dos soros de, no mínimo, quatro cobaias que apresentem ganho de peso.

Controle do limite morte (L+/50) da toxina diftérica padronizada: distribuir em uma série de tubos de ensaio volumes constantes de antitoxina diftérica de referência, aferida por padrão internacional, de maneira que o volume a inocular contenha 1 UI. Acrescentar volumes variáveis de toxina diftérica padronizada e igualar os volumes de todos os tubos com solução salina tamponada contendo 1% (p/v) de peptona. Homogeneizar e incubar a 37 °C por 60 minutos. Inocular volume constante de cada diluição, por via subcutânea, em quatro cobaias pesando entre 250 g e 350 g. Observar os animais em relação à mortalidade por período de 96 horas após a inoculação. Calcular a dose letal 50% (L+/50) por método estatístico adequado.

Titulação do soro: distribuir em uma série de tubos de ensaio, volumes variáveis do soro. Acrescentar volume constante de toxina diftérica padronizada, de maneira que o volume a inocular por animal contenha 1 L+/50 (limite morte). Igualar os volumes de todos os tubos com solução salina tamponada contendo 1% (p/v) de peptona. Homogeneizar e incubar a 37 °C por 60 minutos. Inocular cada mistura, por via subcutânea, no mínimo quatro cobaias pesando 250 g e 350 g. Observar os animais por período de 96 horas após a inoculação e registrar o número de vivos em cada mistura. Os valores das doses efetivas médias (DE50) da amostra e da antitoxina de referência são determinados, utilizando método estatístico adequado. Para a determinação ser considerada válida é necessário que: (a) a faixa da resposta produzida (DE50) esteja entre a maior e menor diluição utilizada na amostra teste e padrão, formando a curva de regressão que devem apresentar uma relação linear; (b) os limites de confiança ($p = 0,95$) estejam entre 50% e 200% da potência calculada; (c) paralelismo entre a curva da referência e amostras. Calcular a atividade imunogênica pela equação:

$$AI = \frac{A}{B} \times C$$

em que,

AI = atividade imunogênica em UI/mL;
 A = DE₅₀ da antitoxina de referência;
 B = DE₅₀ da amostra;
 C = UI/mL da antitoxina de referência.

No mínimo 2 UI/mL. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Pode ser utilizado um método *in vitro*, como ensaio imunoenzimático ou citotoxicidade em célula Vero, desde que sejam validados contra o teste de soroneutralização descrito.

B. Por Desafio em cobaia. Comprovar a atividade imunogênica do produto em teste por comparação com toxoide diftérico de referência. Separar oito grupos de, no mínimo, 16 cobaias pesando entre 250 g e 350 g. Efetuar quatro diluições da amostra em teste com solução de cloreto de sódio a 0,85% (p/v), utilizando fator de diluição 2. Proceder da mesma forma com o toxoide diftérico de referência. Inocular, por via subcutânea, volume de 1 mL por animal, de cada diluição. Separar um grupo de 12 animais sem inocular, para controle da toxina de desafio. Após 28 dias da inoculação, diluir a toxina diftérica padronizada em solução salina tamponada contendo 1% (p/v) de peptona, de modo a conter 100 DL₅₀/mL (dose letal 50%) e inocular cada cobaia imunizada, por via subcutânea, com volume de 1 mL da dose desafio de toxina. Observar os animais até 96 horas após a inoculação e registrar o número de vivos em cada diluição. Paralelamente, como controle da dose desafio, efetuar diluição 1:100 a partir da solução de toxina que contém 100 DL₅₀/mL, utilizando o mesmo diluente. Inocular 1 mL da diluição, por via subcutânea, em cada uma de cinco cobaias. Observar os animais até 96 horas após a inoculação e registrar o número de mortos na diluição. Calcular as Doses Efetivas 50% (DE₅₀) da amostra em teste e do toxoide de referência, utilizando método de análise estatística adequado. A faixa de resposta produzida (porcentagem de sobrevivência) deve estar entre a maior e a menor diluição utilizada na amostra teste e padrão, os limites de confiança ($P = 0,95$) devem estar compreendidos entre 50% e 200% da potência estimada e a análise estatística deve mostrar linearidade e paralelismo das curvas dose resposta. Calcular a atividade imunogênica pela equação:

$$AI = \frac{A}{B} \times C$$

em que,

AI = atividade imunogênica em UI/dose individual humana;

A = DE₅₀ do toxoide de referência;

B = DE₅₀ da amostra;

C = UI/dose individual humana do toxoide de referência.

No mínimo 30 UI/dose individual humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente tetânico. Proceder às determinações de atividade imunogênica, utilizando um dos métodos descritos na monografia de *Toxoide tetânico adsorvido*. No mínimo 2 UI/mL (método **A.**). No mínimo 40 UI/dose individual humana (método **B.**). No mínimo 40 UI/dose individual humana (método **C.**). É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO E PERTUSSIS

Vaccinum diphtheriae et tetani et pertussis adsorbatum

vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis; 09040

A vacina é uma mistura de anatoxinas diftérica e tetânica e suspensão de células inteiras mortas de *Bordetella pertussis*, diluídas em solução salina tamponada e adsorvidas pelo hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, podendo conter um conservante. É uma suspensão opalescente, ligeiramente acastanhada, que não apresenta grumos ou partículas estranhas.

Componente diftérico: a anatoxina diftérica purificada cumpre as especificações de produção e controles descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

Componente tetânico: a anatoxina tetânica purificada cumpre com as especificações de produção e controles descritos na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*.

Componente pertussis: a vacina pertussis é suspensão homogênea de células inteiras mortas de uma ou mais cepas de *B. pertussis* em solução fisiológica. As cepas empregadas na preparação de vacinas são identificadas por registros históricos completos, incluindo sua origem, características de isolamento e todas as provas efetuadas periodicamente para verificar as características das cepas. As cepas devem ser liofilizadas na fase I contendo pelo menos os aglutinógenos 1, 2 e 3 e mantidas à temperatura máxima de 4 °C.

A produção da vacina se baseia no sistema de lote-semente, que deve ter as mesmas características do lote original. O meio de cultura utilizado no cultivo de *B. pertussis* deve possibilitar a manutenção dos aglutinógenos e da atividade imunogênica. Esse meio não pode aumentar a toxicidade específica da cepa e não conter substâncias capazes de induzir reações tóxicas e/ou alérgicas ao ser humano. Ao final do cultivo, as bactérias são coletadas, lavadas para remover substâncias derivadas do meio de cultura e ressuspendidas em solução fisiológica isotônica. Amostras das coletas individuais são avaliadas quanto à opacidade e pureza bacteriana. A suspensão pode ser inativada pelo aquecimento a 56 °C por tempo determinado ou destoxificada pela adição de agentes químicos em condições adequadas de pH, temperatura e tempo de tratamento. Amostras da suspensão são avaliadas quanto à inativação bacteriana, semeando em meio de cultura apropriado, à pureza, identificação, esterilidade e submetidas aos controles que se seguem.

Formaldeído residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm.

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra da vacina. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

Determinação de atividade imunogênica. Proceder conforme descrito para o produto final. No mínimo 4 UI/dose.

Presença de aglutinógeno. Transferir 50 µL da amostra para três lâminas de vidro e adicionar 50 µL de soro mono-específico de aglutinógenos 1, 2 e 3 sobre as amostras em cada uma das lâminas. Homogeneizar por um minuto e deixar em repouso por três minutos. Observar a aglutinação da amostra nas três lâminas, no máximo, por cinco minutos. A cepa de *B. pertussis* deve apresentar aglutinação com os três soros monovalentes específicos.

Opacidade. Realizar em período máximo de 15 dias após a preparação da suspensão. Aferir com padrão turbidimétrico aprovado pela autoridade nacional de controle. É atribuído a esse padrão valor

de 10^6 unidades opacimétricas, quando examinado por fotometria, utilizando filtro verde, ao comprimento de onda de 530 nm. Tal grau de opacidade corresponde aproximadamente a 10^9 bactérias/mL. Colocar 1 mL da amostra em tubo de ensaio e adicionar solução salina fisiológica até opacidade semelhante ao padrão. Comparar visualmente a opacidade contra a preparação de referência de opacidade. A unidade de opacidade (UOp) é determinada pela equação:

$$UOp/mL = \frac{\text{volume final da amostra diluída}}{\text{volume inicial}} \times 10$$

Para o componente pertussis, a concentração de bactérias deve ser no máximo de 20 UOp/dose.

Toxicidade específica. Diluir a amostra em solução fisiológica para concentração máxima correspondente a 20 UOp/dose. Utilizar dois grupos com, pelo menos, 10 camundongos albinos suíços pesando entre 14 e 16 g. Imediatamente antes da inoculação, determinar o peso total dos animais. Inocular 0,5 mL da amostra diluída, por via intraperitoneal, em cada camundongo do primeiro grupo. Para o segundo grupo, proceder conforme descrito, inoculando solução fisiológica contendo a mesma quantidade de agente conservante que o inóculo injetado nos animais do grupo de prova. Determinar o peso total de cada um dos grupos de camundongos no 3º e 7º dia após a inoculação. O produto é considerado atóxico se (a) no 3º dia o peso total do grupo é no mínimo seu peso inicial; (b) no 7º dia a média de ganho de peso do grupo inoculado com a amostra é no mínimo 60% da média de ganho de peso do grupo controle negativo, e (c) morrerem no máximo 10% dos animais inoculados com a amostra.

A vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis é preparada pela diluição e adsorção em compostos de alumínio de quantidades determinadas de anatoxinas diftérica e tetânica e células inteiras mortas de *B. pertussis*. Uma dose individual humana pode conter, no máximo, 30 e 25 Lf, para os componentes diftérico e tetânico, respectivamente. Para o componente pertussis, a concentração de bactérias deve ser no máximo de 20 UOp/dose. Antes do envase, amostras do produto são submetidas aos controles de esterilidade, pH, formaldeído residual, timerosal, alumínio, toxicidade específica e determinação de atividade imunogênica para cada componente.

O produto é envasado em recipientes adequados, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

Adicionar citrato de sódio à amostra da vacina até que se obtenha uma concentração de 5% a 10% de citrato de sódio. Manter a 37 °C por aproximadamente 16 horas e centrifugar. Utilizar o sobrenadante para identificar os componentes diftérico e tetânico, usando antissoros específicos. Ressuspender o precipitado para identificar o componente pertussis. Outros métodos adequados podem ser utilizados para separação do adjuvante.

Componente diftérico. Proceder conforme descrito em *Identificação* na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

Componente tetânico. Proceder conforme descrito em *Identificação* na monografia de *Toxoide tetânico adsorvido*.

Componente pertussis

A. Transferir 50 µL da amostra em lâmina de vidro e adicionar o mesmo volume do antissoro polivalente de *B. pertussis*. Homogeneizar a mistura com movimentos circulares, por um minuto, e

manter o material em repouso por três minutos. Observar a aglutinação da amostra, no máximo por cinco minutos.

B. A *Determinação da atividade imunogênica* pode ser utilizada.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra da vacina. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Alumínio. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 1,25 mg/dose individual humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Formaldeído residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Timerosal. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

Toxicidade específica para o componente pertussis. Cumpre o teste já descrito.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOGÊNICA

A atividade imunogênica da vacina é determinada para cada um dos componentes. Não existem padrões internacionais de referência para as vacinas combinadas e a atividade de cada componente se expressa em unidades internacionais, mediante a comparação com padrões de referência aferidos por padrões de referência dos componentes.

Componente diftérico. Proceder à determinação de atividade imunogênica, utilizando um dos métodos descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*. No mínimo 2 UI/mL (método A). No mínimo 30 UI/dose individual humana (método B). É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente tetânico. Proceder às determinações de atividade imunogênica, utilizando um dos métodos descritos na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*. No mínimo 2 UI/mL (método A). No mínimo 60 UI/dose individual humana (método B). No mínimo 40 UI/dose individual humana (método C). É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente pertussis. A atividade imunogênica é determinada pela avaliação comparativa diante da vacina de referência padronizada contra o padrão internacional para a vacina pertussis. Utilizar camundongos albinos suíços pesando entre 12 g e 16 g, procedentes de grupo homogêneo de linhagem padronizada. Os animais devem ser preferencialmente do mesmo sexo. Para cada diluição da amostra

e da vacina de referência utilizar, no mínimo, 16 animais. Para controle da dose desafio, separar grupos de pelo menos 10 camundongos.

Imunização dos animais: efetuar, pelo menos, três diluições seriadas da amostra e da vacina de referência em solução fisiológica tamponada, de modo que a diluição intermediária se aproxime de uma proteção de 50% dos camundongos dos efeitos letais da dose desafio de *B. pertussis*. Sugere-se utilizar fator de diluição 5 (cinco). Inocular, por via intraperitoneal, 0,5 mL das diluições em cada um dos camundongos de cada grupo de imunização. Manter os animais dos grupos controle sem inocular. O intervalo entre a imunização e o desafio é de 14 a 17 dias.

Desafio: reconstituir uma ampola do lote da cepa de *B. pertussis* com solução aquosa contendo peptona de caseína 1% (p/v) e NaCl 0,6% (p/v), pH 7,0 a 7,2. A cepa desafio deve ser capaz de induzir a morte em camundongos após 14 dias de uma inoculação intracerebral, devendo ser rejeitada caso haja morte de mais de 20% dos animais nas primeiras 48 horas.

Semear em tubos de ensaio e placas contendo meio apropriado e incubar entre 35 °C e 37 °C por até 48 horas. Fazer um repique do cultivo em placas e tubos com ágar Bordet-Gengou ou outro meio apropriado e incubar entre 35 °C e 37 °C por 24 horas. Um segundo repique deve ser realizado nas mesmas condições descritas e incubado por 18 horas. Os cultivos obtidos nas placas são utilizados para observar as colônias e identificá-las por soroaglutinação contra antissoro específico para a cepa. Alternativamente, alíquotas da suspensão para o desafio podem ser congeladas e mantidas em nitrogênio líquido e, após o descongelamento e diluição, podem ser utilizadas diretamente como cultivo de desafio. Preparar suspensão, utilizando diluente adequado em que os micro-organismos se mantenham viáveis, de modo a conter 10 UOp/mL, por comparação com o 5º padrão internacional de opacidade. Ajustar a solução de maneira que cada dose desafio contenha 100 a 1000 DL₅₀ (dose letal 50%) em 30 µL e inocular em cada camundongo imunizado, por via intracerebral. Para se obter estimativa da DL₅₀, inocular diluições seriadas da dose desafio, por via intracerebral, em cada um dos grupos controle. Cultivar diluição da dose desafio em meio Bordet-Gengou para determinar o número de unidades formadoras de colônia (UFC). O valor da dose efetiva 50% (DE₅₀) da amostra em teste é determinado, utilizando um método estatístico adequado. O teste é válido se: (a) a faixa de resposta produzida (porcentagem de sobrevivência) estiver entre a maior e a menor diluição utilizada da amostra teste e do padrão; (b) os limites de confiança (P = 0,95) estiverem compreendidos entre 65% e 156% da potência estimada e a análise estatística demonstrar linearidade e paralelismo das curvas dose resposta; (c) a dose de desafio estiver entre 100 e 1000 DL₅₀ e (d) a DL₅₀ contiver no máximo 300 unidades formadoras de colônias. A atividade imunogênica é calculada pela equação:

$$AI = \frac{A}{B} \times C$$

em que,

AI = atividade imunogênica em UI/dose individual humana;

A = DE₅₀ da vacina pertussis de referência;

B = DE₅₀ da amostra;

C = UI/dose individual humana da vacina de referência.

A potência deve ser de, no mínimo, 4 UI/dose individual humana e o limite inferior de confiança (P=0,95) estimado não pode ser menor que 2 UI/dose. Se a atividade imunogênica determinada não cumprir com a potência ou com o limite inferior de confiança, o teste pode ser repetido. O produto cumpre os requisitos se a média geométrica ponderada de todos os resultados válidos apresentar

potência mínima e limite inferior de confiança ($P=0,95$) para aprovação. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS E HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)

Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis adsorbatum et haemophili stirpe b conjugatum

A vacina adsorvida difteria, tétano, pertussis e *Haemophilus influenzae* b (conjugada) é uma vacina combinada composta de anatoxinas diftérica e tetânica e suspensão de células inteiras mortas de *Bordetella pertussis* e poliribosil-ribitol fosfato (PRP) purificado de *Haemophilus influenzae* b covalentemente ligado a uma proteína carreadora, diluídas em solução salina tamponada e adsorvidas pelo hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, podendo conter um conservante. O produto pode ser apresentado como uma preparação líquida tetravalente no mesmo frasco ou com o componente *Haemophilus influenzae* b liofilizado em frasco-ampola, o qual é reconstituído, imediatamente antes do uso, pela vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis.

Componente diftérico: a anatoxina diftérica purificada cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

Componente tetânico: a anatoxina tetânica purificada cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Toxoide tetânico adsorvido*.

Componente pertussis: a vacina pertussis cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*.

Componente polissacarídeo: cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

Nos ensaios de potência na vacina combinada, pode ser utilizada, como referência, uma vacina combinada ou cada um dos seus antígenos em separado. Caso isso não seja possível devido à interação entre os componentes da vacina combinada ou diferença na composição entre a vacina de referência monocomponente e a vacina sob teste, um lote de vacina combinada que tenha mostrado efetividade em estudo clínico ou então um lote representativo é usado como vacina de referência. Na produção de um lote representativo é necessário seguir rigorosamente o processo de produção utilizado para o lote testado em estudo clínico. A vacina de referência pode ser estabelecida por um método adequado que não interfere no procedimento do ensaio.

As vacinas produto acabado a granel são preparadas separadamente, sendo uma delas pela adsorção, em compostos de alumínio, de quantidades determinadas de anatoxinas diftérica e tetânica, células inteiras mortas de *B. pertussis* e a outra com o componente *Haemophilus influenzae* b. O produto também pode ser formulado pela adsorção, em compostos de alumínio, de quantidades determinadas de anatoxinas diftérica e tetânica, células inteiras mortas de *B. pertussis* e PRP conjugado. Um conservante adequado pode ser adicionado no produto. Antes do envase, amostras do produto são submetidas aos controles de esterilidade, pH, toxicidade específica para pertussis, formaldeído residual, preservativo antimicrobiano, alumínio, determinação de atividade imunogênica para os componentes diftérico, tetânico, pertussis e polissacarídeo residual.

Os produtos são envasados em recipientes adequados, rotulados e submetidos aos controles requeridos.

As vacinas preparadas como produto acabado a granel, assim como envasadas, separadamente, uma delas contendo os componentes diftérico, tetânico e pertussis e a outra o componente *Haemophilus influenzae* b, devem estar de acordo com as respectivas monografias de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis* e *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

IDENTIFICAÇÃO

Dissolver a amostra da vacina adsorvida com citrato de sódio a pH 9,0 para obter solução a 10% (p/v). Manter a 37 °C durante aproximadamente 16 horas e centrifugar. Utilizar o líquido sobrenadante para identificar cada um dos componentes, diftérico ou tetânico. Ressuspender o precipitado para identificar o componente pertussis. Outros métodos adequados podem ser utilizados para separação do adjuvante.

Componente diftérico. Cumpre os testes de *Identificação* para *Componente diftérico* descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

Componente tetânico. Cumpre os testes de *Identificação* descritos na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*.

Componente pertussis. Cumpre os testes de *Identificação* para *Componente pertussis* descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*.

Componente *Haemophilus influenzae* b. Cumpre os testes de *Identificação* descritos na monografia de *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra da vacina líquida tetravalente ou, no caso do componente haemophilus liofilizado, o pH deve ser determinado após a reconstituição com o diluente adequado. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Cumpre os testes descritos em *Ensaio físico-químico* das monografias *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)* e *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Cumpre os testes descritos em *Testes de segurança biológica* das monografias *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)* e *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*.

DOSEAMENTO

Componente diftérico

Cumpre o *Doseamento* descrito na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente tetânico

Cumpre o *Doseamento* descrito na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente pertussis

Cumpra o *Doseamento* descrito na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente *Haemophilus influenzae b*

Cumpra o *Doseamento* descrito na monografia de *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS, HEPATITE B (RECOMBINANTE) E HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)
Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis, hepatitis B adsorbatum et haemophili stirpe b conjugatum

A vacina adsorvida difteria, tétano, pertussis, hepatite B (recombinante) e *Haemophilus influenzae* b (conjugada) é uma vacina combinada composta de anatoxinas diftérica e tetânica, suspensão de células inteiras mortas de *Bordetella pertussis*, suspensão de antígeno (HBsAg) purificado da superfície do vírus da hepatite B, poliribosil-ribitol fosfato (PRP) purificado de *Haemophilus influenzae* b covalentemente ligado a uma proteína carreadora, diluídas em solução salina tamponada e adsorvidas pelo hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, podendo conter um conservante. O produto pode ser apresentado com o componente *Haemophilus influenzae* b em um frasco-ampola separado, o qual é misturado aos outros componentes da vacina imediatamente antes do uso.

Componente diftérico: a anatoxina diftérica purificada cumpre as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

Componente tetânico: a anatoxina tetânica purificada cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*.

Componente pertussis: a vacina pertussis cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*.

Componente hepatite B: a vacina hepatite B cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Vacina hepatite B (recombinante)*.

Componente Polissacarídeo: cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

Se a vacina é apresentada com o componente *Haemophilus influenzae* b em frasco-ampola separado, os ensaios realizados nos componentes difteria, tétano, pertussis e hepatite B devem mostrar consistência em um número adequado de lotes da vacina combinada reconstituída antes do uso. Para controles de rotina subsequentes, os testes realizados nesses componentes devem ser desenvolvidos sem a mistura com o componente *Haemophilus influenzae* b.

Nos ensaios de potência na vacina combinada pode ser utilizada, como referência, uma vacina combinada ou cada um dos seus antígenos em separado. Caso isso não seja possível devido à interação entre os componentes da vacina combinada ou diferença na composição entre a vacina de referência monocomponente e a vacina sob teste, um lote de vacina combinada que tenha mostrado efetividade em estudo clínico ou então um lote representativo é usado como vacina de referência. Na produção de um lote representativo é necessário seguir rigorosamente o processo de produção utilizado para o lote testado em estudo clínico. A vacina de referência pode ser estabelecida por um método adequado que não interfere no procedimento do ensaio.

As vacinas produto acabado a granel são preparadas separadamente, sendo uma delas pela adsorção, em compostos de alumínio, de quantidades determinadas de anatoxinas diftérica e tetânica, células inteiras mortas de *B. pertussis* e hepatite B (recombinante) e a outra com o componente *Haemophilus influenzae* b. O produto também pode ser formulado pela adsorção, em compostos de alumínio, de quantidades determinadas de anatoxinas diftérica e tetânica, células inteiras mortas de *B. pertussis*, PRP conjugado e hepatite B (recombinante). Um preservativo antimicrobiano adequado pode ser adicionado no produto. Antes do envase, amostras do produto são submetidas aos controles de esterilidade, pH, toxicidade específica para pertussis, formaldeído residual, preservativo

antimicrobiano, alumínio, determinação de atividade imunogênica para os componentes diftérico, tetânico, pertussis, hepatite B e polissacarídeo residual.

Os produtos são envasados em recipientes adequados, rotulados e submetidos aos controles requeridos.

As vacinas preparadas como produto acabado a granel, assim como envasadas, separadamente, uma delas contendo os componentes diftérico, tetânico, pertussis e hepatite B, e a outra o componente *Haemophilus influenzae b*, devem estar de acordo com as respectivas monografias de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*, *Vacina hepatite B (recombinante)* e *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

IDENTIFICAÇÃO

Dissolver a amostra da vacina adsorvida com citrato de sódio a pH 9,0 para se obter solução a 10% (p/v). Manter a 37 °C por aproximadamente 16 horas e centrifugar. Utilizar o líquido sobrenadante para identificar cada um dos componentes, diftérico ou tetânico. Ressuspender o precipitado para identificar o componente pertussis. Outros métodos adequados podem ser utilizados para separação do adjuvante.

Componente diftérico. Cumpra a *Identificação* descrita na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

Componente tetânico. Cumpra a *Identificação* descrita na monografia de *Toxoide tetânico adsorvido*.

Componente pertussis. Cumpra a *Identificação* descrita na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*.

Componente hepatite B. Cumpra a *Identificação* descrita na monografia de *Vacina hepatite B (recombinante)*.

Componente *Haemophilus influenzae b*. Cumpra os testes de *Identificação* descritos na monografia de *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra da vacina líquida pentavalente ou, no caso do componente haemophilus liofilizado, o pH deve ser determinado após a reconstituição com o diluente adequado. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Realizar os ensaios requeridos em *Ensaios físico-químicos*, descritos nas monografias *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*, *Vacina hepatite B (recombinante)* e *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Realizar os ensaios requeridos em *Testes de segurança biológica*, descritos nas monografias *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*; *Vacina hepatite B (recombinante)* e *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

DOSEAMENTO

Componente diftérico

Cumpra o *Doseamento* descrito na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente tetânico

Cumpra o *Doseamento* descrito na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente pertussis

Cumpra o *Doseamento* descrito na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente hepatite B

Cumpra o *Doseamento* descrito na monografia de *Vacina hepatite B (recombinante)*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente *Haemophilus influenzae b*

Cumpra o *Doseamento* descrito na monografia de *Vacina *Haemophilus influenzae b* (conjugada)*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS, POLIOMIELITE 1, 2 E 3 (INATIVADA) E HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)
Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis, poliomyelitidis typus I, II, III adsorbatum et haemophili stirpe b conjugatum

A vacina adsorvida difteria, tétano, pertussis, poliomielite 1, 2 e 3 (inativada) e *Haemophilus influenzae* b (conjugada) é uma vacina combinada composta de anatoxinas diftérica e tetânica, suspensão de células inteiras mortas de *Bordetella pertussis*, cepas de poliovírus humano tipos 1, 2 e 3 cultivados em células e inativadas por um método adequado e poliribosil-ribitol fosfato (PRP) purificado de *Haemophilus influenzae* b covalentemente ligado a uma proteína carreadora; diluídos em solução salina tamponada e adsorvidos pelo hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, podendo conter um conservante. O produto pode ser apresentado com o componente *Haemophilus influenzae* b em um frasco-ampola separado, o qual é misturado aos outros componentes da vacina imediatamente antes do uso.

Componente diftérico: a anatoxina diftérica purificada cumpre as especificações de produção e controles descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

Componente tetânico: a anatoxina tetânica purificada cumpre as especificações de produção e controles descritos na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*.

Componente pertussis: a vacina pertussis cumpre as especificações de produção e controles descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*.

Componente poliomielite: a vacina poliomielite cumpre as especificações de produção e controles descritos na monografia de *Vacina poliomielite 1, 2 e 3 (inativada)*.

Componente polissacarídeo: cumpre as especificações de produção e controles descritos na monografia de *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

Os ensaios realizados em cada um dos componentes devem manter consistência em um número adequado de lotes da vacina combinada reconstituída antes do uso. Para controles de rotina subsequentes, os testes realizados nesses componentes devem ser desenvolvidos sem a mistura com o componente *Haemophilus influenzae* b.

Nos ensaios de potência na vacina combinada, podem ser utilizadas vacinas de referência monocomponentes. Caso isso não seja possível devido à interação entre os componentes da vacina combinada, ou diferença na composição entre a vacina de referência monocomponente e a vacina sob teste; um lote de vacina combinada que tenha mostrado efetividade em estudo clínico ou então um lote representativo é usado como vacina de referência. Na produção de um lote representativo é necessário seguir rigorosamente o processo de produção utilizado para o lote testado em estudo clínico. A vacina de referência pode ser estabelecida por um método adequado que não interfere no procedimento do ensaio.

As vacinas produto acabado a granel são preparadas separadamente, sendo uma delas pela adsorção, em compostos de alumínio, de quantidades determinadas de anatoxinas diftérica e tetânica, células inteiras mortas de *B. pertussis* e poliomielite, e a outra com o componente *Haemophilus influenzae* b. O produto também pode ser formulado pela adsorção, em compostos de alumínio, de quantidades determinadas de anatoxinas diftérica e tetânica, células inteiras mortas de *B. pertussis*, PRP conjugado e poliomielite. Um preservativo antimicrobiano adequado pode ser adicionado no produto. Antes do envase, amostras do produto são submetidas aos controles de esterilidade, pH, toxicidade específica

para pertussis, formaldeído residual, preservativo antimicrobiano, alumínio, polissacarídeo residual e determinação de atividade imunogênica para os componentes diftérico, tetânico e pertussis.

O produto é envasado em recipientes adequados, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

Dissolver a amostra da vacina adsorvida com citrato de sódio a pH 9,0 para se obter solução a 10% (p/v). Manter a 37 °C por aproximadamente 16 horas e centrifugar. Utilizar o líquido sobrenadante para identificar cada um dos componentes, diftérico ou tetânico. Suspender o precipitado para identificar o componente pertussis. Outros métodos adequados podem ser utilizados para separação do adjuvante.

Componente diftérico. Proceder conforme descrito em *Identificação* na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

Componente tetânico. Proceder conforme descrito em *Identificação* na monografia de *Toxoide tetânico adsorvido*.

Componente pertussis. Proceder conforme descrito em *Identificação* na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*.

Componente poliomielite. Proceder conforme descrito em *Identificação* na monografia de *Vacina poliomielite 1, 2 e 3 (inativada)*.

Componente *Haemophilus influenzae* b. Proceder conforme descrito em *Identificação* na monografia de *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra da vacina líquida contendo todos os antígenos ou, no caso do componente haemophilus liofilizado, o pH deve ser determinado após a reconstituição com o diluente adequado. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proceder conforme descrito em *Ensaio físico-químico* das monografias de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*, *Vacina poliomielite 1, 2 e 3 (inativada)* e *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Proceder conforme descrito em *Testes de segurança biológica* das monografias de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*, *Vacina poliomielite 1, 2 e 3 (inativada)* e *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

DOSEAMENTO

Componente diftérico

Proceder conforme descrito em *Doseamento* na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente tetânico

Proceder conforme descrito em *Doseamento* na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente pertussis

Proceder conforme descrito em *Doseamento* na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente poliomielite

Proceder conforme descrito em *Doseamento* na monografia de *Vacina poliomielite 1, 2 e 3 (inativada)*.

Componente *Haemophilus influenzae b*

Proceder conforme descrito em *Concentração de PRP* na monografia de *Vacina *Haemophilus influenzae b* (conjugada)*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumprir o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA BCG

Vaccinum BCG

A vacina BCG liofilizada é uma vacina viva obtida a partir do cultivo do Bacilo de Calmette e Guérin, cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, de inocuidade e eficácia reconhecidas, para conferir proteção ao homem contra a tuberculose. O liofilizado é massa bacilar dessecada, com consistência de pó, de cor esbranquiçada ou amarelo pálido, que reconstituída, é ligeiramente turva e de aspecto homogêneo.

A produção da vacina é baseada no sistema de lote-semente, podendo ser realizados no máximo oito subcultivos a partir da cepa original. A cepa selecionada deve conservar sua estabilidade e manter seu caráter não-patogênico tanto para o homem quanto para animais de experimentação. Essa vacina deve ser produzida por equipe em boas condições de saúde, que não trabalhe com agentes infecciosos e, em particular, com cepas virulentas de *Mycobacterium tuberculosis*.

O lote-semente de trabalho deve cumprir com os seguintes requisitos.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste, exceto pela presença de micobactérias.

Identidade. Identificar as bactérias como *Mycobacterium bovis* BCG, utilizando-se técnicas microbiológicas e de biologia molecular, como amplificação de ácido nucléico.

Micobactérias virulentas. Cumpre o teste descrito para o produto final.

A bactéria é inoculada em meio de cultura apropriado, isento de substâncias que possam causar reações tóxicas e/ou alérgicas ao ser humano. Os cultivos e o meio de cultura de cada recipiente são examinados visualmente quanto ao aspecto, apresentando véu bacteriano na superfície e meio de cultura límpido. Os cultivos são transferidos para novo meio e, após crescimento, são testados quanto à esterilidade e avaliados visualmente quanto à transparência do meio e aspecto do véu bacteriano. Após a filtração do véu bacteriano, esse é ressuscitado em meio apropriado e submetido aos testes de respiração bacteriana, opacidade e esterilidade. A suspensão bacteriana é diluída para o número apropriado de doses e, antes de proceder ao envase, o produto é avaliado quanto ao número de unidades formadoras de colônias e esterilidade. O produto é envasado em ampolas ou frascos-ampola de vidro âmbar classe farmacêutica, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

Observar por microscopia esfregaço obtido após a reconstituição da vacina e corado pela técnica de Ziehl-Nielsen. São detectados somente bacilos álcool-ácido resistentes. Como complemento, observar a morfologia das colônias semeadas no meio de Lowenstein-Jensen, utilizado no *ensaio microbiológico* (unidades formadoras de colônias). As colônias são rugosas, predominantemente espalhadas e não-pigmentadas. Alternativamente, podem ser utilizadas técnicas de biologia molecular.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar após a reconstituição da vacina com diluente apropriado. Os limites devem estar de acordo com o histórico do registro do produto.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 3%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

Micobactérias virulentas. Reconstituir o conteúdo das ampolas com o diluente recomendado, de forma a se obter 50 doses humanas. Inocular volume de 1 mL em cada uma de seis cobaias, pesando de 250 g a 400 g, por via subcutânea, na região abdominal, do lado direito. Manter os animais em observação por 42 dias. Ao final do período, pesar, sacrificar e necropsiar os animais. Examinar o local da inoculação, os gânglios regionais, inguinais, axilares, mediastínicos, lombares, portal e demais órgãos, em particular os pulmões, fígado, baço e rins.

Nenhuma cobaia pode apresentar evidência de tuberculose progressiva e, pelo menos, 2/3 dos animais têm que sobreviver ao final do período de observação, com ganho de peso. Repetir o teste se mais que 1/3 dos animais morrerem ou perderem peso. O ensaio pode ser omitido no produto final se foi obtido resultado satisfatório no produto a granel.

Reatividade cutânea. Reconstituir uma amostra e preparar diluições 1:10 e 1:100, utilizando o diluente recomendado. Inocular, por via intradérmica, 0,1 mL de cada uma das diluições no flanco esquerdo de quatro cobaias albinas de mesmo sexo, com peso mínimo de 350 g cada. Os animais têm que apresentar reação tuberculínica negativa, bem como não podem ter sofrido tratamento que possa dar falso negativo. Proceder conforme descrito para a vacina de referência, inoculando o mesmo animal no flanco direito. Observar os animais por quatro semanas e realizar leituras semanais do diâmetro das lesões encontradas nos pontos de inoculação. Ao final do período de observação, calcular, para cada diluição correspondente, a média das quatro leituras da vacina e da vacina de referência. A vacina cumpre o requisito se a reação produzida pela amostra é semelhante à da vacina de referência. O ensaio no produto final pode ser omitido se foi realizado no lote-semente de trabalho e em cinco lotes finais consecutivos derivados do mesmo lote-semente.

ENSAIO MICROBIOLÓGICO

Número de unidades formadoras de colônias (UFC)

Reconstituir cinco ampolas da vacina com diluente recomendado, tendo o cuidado de adicioná-lo suavemente para evitar a formação de espuma. Transferir o conteúdo das ampolas para um único tubo de ensaio, homogeneizar e proceder três diluições, de modo a obter número ótimo de colônias em torno de 40, desprezando as contagens superiores a 100. Inocular em meio Lowenstein-Jensen, utilizando cinco tubos para cada uma das duas diluições mais concentradas e 10 tubos para a mais diluída. Vedar os tubos e incubar na posição vertical à temperatura de 37 °C, por quatro semanas. Analisar em paralelo uma amostra da vacina de referência e expressar os resultados em UFC/mL. A faixa de aceitação deve estar de acordo com o histórico do registro do produto submetido à autoridade regulatória nacional, sendo que o limite máximo não deve ultrapassar quatro vezes o limite definido como o mínimo.

Se for utilizada a bioluminescência ou qualquer outro método, o mesmo deve ser validado contra o método de contagem de viáveis.

TERMOESTABILIDADE

Incubar cinco ampolas da vacina à temperatura de 37 °C por quatro semanas e proceder conforme *Ensaio microbiológico*. Comparar os resultados obtidos com os das amostras mantidas à temperatura

de 2 °C a 8 °C. O número de UFC/mL não pode ser inferior a 20% de UFC/mL da vacina mantida entre 2 °C e 8 °C.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA CAXUMBA (ATENUADA)

Vaccinum parotiditis vivum

vacina caxumba (atenuada); 09037

A vacina caxumba (atenuada) é constituída de vírus vivos atenuados, apresentada sob a forma liofilizada. Após a reconstituição com diluente apropriado, tem aspecto de suspensão homogênea transparente, podendo demonstrar coloração devido à presença de indicador de pH.

A produção da vacina é baseada no sistema de lote-semente e a cepa de vírus utilizada ou cinco lotes consecutivos da vacina não podem induzir a neuropatogenia em macacos suscetíveis ao vírus da caxumba. Além disso, a cepa viral tem que demonstrar imunogenicidade adequada e segurança para o ser humano. A replicação do vírus é realizada em cultura de células suscetíveis e a suspensão viral é identificada e controlada quanto à esterilidade. Após a clarificação da suspensão viral por método adequado, para remoção de resíduos celulares, são adicionadas algumas substâncias estabilizadoras, que comprovadamente não alteram a eficácia, nem a segurança do produto. Antes do envase e liofilização, o produto é analisado quanto à esterilidade, concentração de vírus e de proteínas derivadas de soro animal utilizado.

A vacina é envasada em recipientes adequados, liofilizada, rotulada e submetida aos controles requeridos.

Outras informações relativas aos critérios de produção e seus controles estão indicadas na monografia de *Vacinas para uso humano*.

IDENTIFICAÇÃO

Reconstituir a vacina com diluente apropriado e adicionar igual volume de soro, contendo anticorpos neutralizantes para o vírus da caxumba. Incubar a 36 °C por uma hora. Após a incubação, inocular a mistura em cultura de células suscetíveis e manter à temperatura de 36 °C por 10 dias. Utilizar como controle cultura de células inoculada com o vírus vacinal e outra não-inoculada, que apresentam, ao final do teste, presença e ausência de efeito citopatogênico, respectivamente. A ausência de ECP na cultura de células identifica o vírus vacinal.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 2%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Proceder à determinação ao abrigo da luz direta. Diluir duas amostras da vacina e uma amostra da vacina de referência a intervalos de, no mínimo, 1,0 log₁₀, em meio de cultura adequado. Inocular cada diluição em, pelo menos, 10 orifícios de microplaca contendo células Vero em suspensão e incubar à temperatura de 36 °C por 10 dias. Observar as culturas de células quanto à presença ou ausência de ECP e calcular o título da vacina por método estatístico comprovado. A potência da vacina é o valor da média geométrica dos frascos analisados, expressa em CCID₅₀ (dose 50% infectante em cultura de célula) por dose. Para a determinação ser considerada válida, é necessário

que: (a) ao final do ensaio o controle da cultura de células apresente monocamada inalterada; (b) a variação de potência entre as duas amostras da vacina seja, no máximo, $0,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}$; (c) a variação do título da vacina de referência seja, no máximo, $0,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}$ do seu título médio; (d) o ECP seja decrescente em relação às diluições crescentes; (e) as diluições utilizadas no ensaio estejam entre 10% e 90% das culturas de células inoculadas.

A potência da vacina é, no mínimo, $103,7 \text{CCID}_{50}/\text{dose}$. Caso não cumpra o requisito, repetir a determinação. A potência da vacina é a média geométrica dos dois ensaios realizados.

Pode ser empregado, também, o método de unidades formadoras de “plaque” (UFP). O valor de potência para aprovação do produto tem que estar correlacionado com o de CCID_{50} .

TERMOESTABILIDADE

O teste é realizado em paralelo a *Doseamento*. Incubar uma amostra da vacina a 37°C , por sete dias, e analisar conforme método descrito para a potência do produto. A vacina não pode perder mais que $1,0 \log_{10} \text{CCID}_{50}/\text{dose}$, em relação ao título da vacina conservada em condições adequadas de temperatura. Não pode, também, ter título inferior ao requisito de potência do produto.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA FEBRE AMARELA (ATENUADA)

Vaccinum febris flavae vivum

A vacina contra febre amarela é constituída de vírus vivos atenuados e apresentada sob a forma liofilizada. Após a reconstituição com diluente apropriado, tem aspecto de suspensão homogênea, podendo demonstrar coloração devido à presença de indicador de pH.

PRODUÇÃO

A produção da vacina é baseada no sistema de lote-semente de vírus da cepa 17D de *Flavivirus hominis*, por meio de passagens em ovos embrionados de galinha livre de patógenos específicos (*specific pathogen free* – SPF). Devem ser empregadas cepas certificadas de vírus. As subcepas atualmente usadas, 17D-204 e 17DD, têm um histórico de passagem bem documentado e registros de segurança, de estudos não clínicos e clínicos. Qualquer nova subcepa 17D a ser usada na produção desta vacina requer a apresentação de dados de suporte para qualificá-la para uso.

Exceto quando justificado e autorizado, o vírus na vacina final deve estar entre os níveis de passagem 204 e 239 da cepa 17D original. Um lote-semente de trabalho deve estar a apenas 1 passagem de um lote-semente mestre. Um lote-semente de trabalho deve ser usado sem passagem intermediária como inóculo para infectar os tecidos usados na produção da vacina.

LOTES-SEMENTE

Cada lote-semente mestre de vírus deve ser submetido aos testes de identificação, e atender aos testes de agentes adventícios (esterilidade bacteriana e fúngica; micoplasmas e micobactérias; teste de ausência de vírus da leucose aviária) conforme a monografia de *Vacinas para uso humano*. Adicionalmente, para a vacina de Febre Amarela, deve ser realizado o teste de inoculação em macacos para verificar viscerotropismo, imunogenicidade e neurotropismo. O teste de inoculação em macacos deve seguir compêndios oficiais internacionais reconhecidos pela autoridade reguladora nacional.

Identificação. Soro contendo anticorpo específico para o vírus da febre amarela deve inibir a formação de unidades formadoras de placa (UFP) em células suscetíveis conforme descrito em *Teste de Potência*. Métodos moleculares, como sequenciamento e amplificação de ácido nucleico, podem ser utilizados.

Caracterização genotípica. Para novos lotes-semente mestre e de trabalho, é recomendada a análise da sequência do genoma dos três primeiros lotes de vacina produzidos, para demonstrar a consistência do processo produtivo.

Cada lote-semente de trabalho de vírus deve ser submetido aos testes de identificação, e atender aos testes de agentes adventícios (esterilidade bacteriana e fúngica; micoplasmas e micobactérias; cultura de células; vírus aviários e teste de ausência de vírus da leucose aviária), conforme a monografia de *Vacinas para uso humano*. Adicionalmente para a vacina de Febre Amarela deve ser realizado o teste de inoculação em macacos para verificar viscerotropismo, imunogenicidade e neurotropismo.

Testes em cultura de células. Inocular 5 mL do lote-semente de trabalho neutralizado, no mínimo 5×10^5 UI, em culturas de células de rim de macaco, de células humanas e de células de fibroblastos de embrião de galinha. Incubar as células em temperatura entre 35 °C e 37 °C e observar por 14 dias. Não deve ser evidenciada a presença de agentes adventícios e, no mínimo, 80% das culturas celulares devem permanecer viáveis.

Vírus aviários. Inocular 1 mL do lote-semente de trabalho neutralizado, no mínimo 10^5 UI, pela via alantoica em 20 ovos SPF embrionados de 11 dias. Proceder da mesma forma, inoculando no saco vitelino, 20 ovos SPF embrionados de 5 a 7 dias. Ao final de sete dias de incubação, pelo menos 80% dos ovos inoculados devem permanecer viáveis, assim como não devem ser evidenciados sinais de agentes hemaglutinantes no fluido do saco vitelínico e na cavidade alantóica e nem sinais de patologias macroscópicas nos embriões e membranas cório-alantoicas.

INOCULAÇÃO VIRAL

A replicação do vírus é realizada em ovos embrionados de galinha SPF, ou em cultura de células suscetíveis. Se a produção da vacina ocorrer em ovos embrionados, 2% e, no mínimo, 20 ovos não infectados com a cepa vacinal têm que ser incubados nas mesmas condições que os ovos inoculados. Os ovos não infectados devem ser testados e obter resultados satisfatórios quanto à ausência de agentes adventícios e vírus aviários.

COLHEITA VIRAL INDIVIDUAL

A suspensão viral é clarificada por método adequado para remoção de resíduos celulares e algumas substâncias estabilizadoras que, comprovadamente, não alteram a eficácia e segurança do produto, podem ser adicionadas. Nenhuma proteína de origem humana pode ser adicionada em qualquer etapa de produção. A suspensão viral, simples ou agrupada, é testada quanto à identificação, esterilidade bacteriana e fúngica, micoplasmas, micobactérias, agentes adventícios e concentração viral.

Extratos dos ovos controle. O extrato dos ovos controle não deve apresentar nenhuma evidência da presença de agentes estranhos nos testes descritos a seguir.

Testes em cultura de células para outros agentes adventícios. Inocular 5 mL da amostra dos extratos dos ovos controles em culturas de células, humanas, de rim de macaco e em fibroblastos de embrião de galinha. Incubar as células em temperatura entre 35 °C e 37° C e observar por 14 dias. Não deve ser evidenciada a presença de agentes adventícios e, no mínimo, 80% das culturas celulares devem permanecer viáveis.

Vírus aviários. Inocular 0,1 mL dos extratos dos ovos controles pela via alantoica em cada um de 10 ovos SPF embrionados de 10 dias. Proceder da mesma forma, inoculando no saco vitelino, 10 ovos SPF embrionados de cinco a sete dias. Ao final de sete dias de incubação, pelo menos 80% dos ovos inoculados devem permanecer viáveis, assim como não devem ser evidenciados sinais de agentes hemaglutinantes no fluido do saco vitelínico e da cavidade alantóica e/ou patologias macroscópicas típicas nos embriões e membranas cório-alantoicas.

Após a formulação, a vacina a granel é analisada quanto à esterilidade e nitrogênio proteico.

Concentração viral. Para calcular a diluição para formulação do produto final, cada colheita viral individual é titulada conforme descrito no ENSAIO DE POTÊNCIA.

PRODUTO FINAL

O produto é envasado em recipiente adequados, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos, descritos abaixo.

Outras informações relativas aos critérios de produção e seus controles estão indicadas na monografia de *Vacinas para uso humano*.

IDENTIFICAÇÃO

A vacina, quando neutralizada com soro contendo anticorpo específico para o vírus da febre amarela, inibe a formação de unidades formadoras de placa (UFP) em células suscetíveis conforme descrito em *Ensaio de potência*. Métodos moleculares como, sequenciamento e amplificação de ácido nucleico, podem ser utilizados.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. Limite máximo deve ser igual ou menor que 3%.

Conteúdo de nitrogênio proteico (5.3.3.2). No máximo, 0,25 mg por dose, antes da adição de qualquer estabilizante. Caso tenha sido realizado na vacina a granel, não há necessidade de ser repetido.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Pirogênios (5.5.2.7). Cumpre o teste. O teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3) pode ser usado. No máximo, 5 UE por dose humana. O teste para pirogênios totais é realizado apenas em casos de evidência da presença de pirogênios não endotoxina. Caso não seja possível o emprego do MAT (5.5.2.7.1), o teste de pirogênios em coelhos (5.5.2.7.2) poderá ser empregado.

Ovoalbumina residual. Determinar o teor de ovoalbumina por *Método imunológico (5.6)* adequado, utilizando como referência uma preparação padrão de ovoalbumina. A vacina é considerada satisfatória se o conteúdo de ovoalbumina residual for menor ou igual a 5 µg/dose. Caso o teste de ovoalbumina tenha sido realizado na vacina a granel e tenha atendido aos requerimentos, não precisa ser realizado no produto final.

ENSAIO DE POTÊNCIA

Concentração viral. Uma vacina de referência calibrada em Unidades Internacionais (UI) deve ser utilizada para a determinação da concentração viral pelo ensaio de potência da vacina.

Pelo menos três frascos de vacina liofilizada em teste e um de vacina de referência são submetidos ao método de unidades formadoras de placa (UFP). Diluir a vacina aplicando-se fator 4 e inocular pelo menos duas diluições em, no mínimo, três orifícios em placa de seis orifícios contendo monocamada de células Vero previamente semeadas. A concentração da linhagem celular pode variar de 100 000 a 300 000 células por mL, conforme o dia de sua utilização. Após adsorção por período de até 90 minutos à temperatura entre 35 °C e 37 °C, em ambiente de CO₂ a 5%, adicionar um meio de cultura contendo agarose ou carboximetilcelulose em concentração adequada. Incubar as placas por cinco a sete dias, à temperatura entre 35°C e 37 °C, em ambiente de CO₂ a 5%. Após o período de incubação, retirar o meio de crescimento, fixar as células com formaldeído e corar com um corante vital.

Calcular a média do número de placa dos frascos da vacina em teste e da vacina de referência, por meio de métodos estatísticos comprovados. Comparar a concentração viral da vacina em teste com aquela da vacina de referência e expressar o resultado em Unidades Internacionais (UI) por dose. A potência mínima deve ser de 3,0 log₁₀ UI por dose. Para a determinação ser considerada válida, é necessário que: (a) no controle de cultura de células haja monocamada inalterada; (b) a variação de potência entre as três amostras da vacina seja no máximo 0,3 log₁₀ UI; (c) a potência da vacina de

referência varie no máximo $0,5 \log_{10}$ UI do seu título estabelecido (d) o número de UFP seja decrescente em relação às diluições crescentes. O ensaio deve ser repetido se não cumprir os requisitos. Outros métodos de ensaio podem ser utilizados, desde que justificados, validados e aprovados pelas autoridades regulatórias nacionais. No entanto, caso a vacina seja dosada pelo método descrito acima, deve cumprir com os requisitos já estabelecidos.

TERMOESTABILIDADE

O teste é realizado em paralelo ao Ensaio de Potência. Incubar, pelo menos, dois frascos de vacina por 14 dias entre 36 °C e 38 °C e analisar conforme descrito em Teste de Potência. A vacina pode perder, no máximo, $1 \log_{10}$ UI em relação ao título determinado na amostra conservada em condições adequadas de temperatura. Além disso, deve ter título no mínimo igual ao especificado para a potência do produto. Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)**Vaccinum haemophili stirpe b conjugatum**

A vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) é uma preparação líquida ou liofilizada de polissacarídeo capsular, obtido a partir de uma cepa de *Haemophilus influenzae* tipo b, covalentemente ligado a uma proteína carreadora.

O polissacarídeo de ribosil-ribitol-5-fosfato (PRP) é um polímero composto de unidades alternadas de ribose e ribitol, covalentemente agrupadas por um fosfato por meio de ligações de fosfatodiestéer. A proteína carreadora, quando conjugada ao polissacarídeo, é capaz de induzir uma resposta imunológica dependente de célula-T.

A produção do polissacarídeo tipo B é baseada no sistema de lote semente, que é uma quantidade de ampolas contendo *H. influenzae* tipo b liofilizado, de composição uniforme, obtido a partir de uma cepa liofilizada de procedência conhecida. Os meios de cultura utilizados para preservar a viabilidade da cepa liofilizada, ou congelada, não devem ser constituídos de proteínas de origem animal. É recomendado que o PRP produzido pelo lote semente seja caracterizado por espectrometria de ressonância magnética nuclear.

O micro-organismo *H. influenzae* tipo b é cultivado em um meio líquido, adequado que não contém polissacarídeos de alto peso molecular. Se algum componente do meio contiver substâncias originárias do sangue, o processo deve ser validado para comprovar que após a purificação elas não são detectadas. Ao final do cultivo verifica-se a pureza da cultura por exame microscópico, inoculação da amostra em meios de cultivo adequados e aglutinação da cultura com antissoro específico. A cultura pode ser inativada. O PRP é separado do meio de cultivo e purificado por um método adequado.

POLISSACARÍDEO HAEMOPHILUS INFLUENZAE (PRP)

O polissacarídeo purificado somente pode ser utilizado na preparação do conjugado se cumprir os seguintes requisitos.

Identificação. O PRP é identificado por um *Método imunológico (5.6)* ou outro método validado, como espectrometria por ressonância magnética nuclear.

Umidade. O teor de umidade do polissacarídeo é determinado por análise termogravimétrica em balança de lâmpada halógena. A perda de peso é determinada em uma amostra seca a 60 °C durante 60 minutos. Transferir 120 mg da amostra para naveta, programar o analisador de umidade e, após o término da análise, transferir quantitativamente a amostra para um balão volumétrico de 10 mL e adicionar água ultrapurificada.

Distribuição por tamanho molecular. Corresponde a porcentagem de PRP, eluído antes de um dado valor de coeficiente de distribuição (Kd) ou dentro de uma faixa de valores de Kd. A distribuição das dimensões moleculares do PRP pode ser determinada por *Cromatografia líquida de alta eficiência (5.2.17.4)* de exclusão por tamanho. O método é realizado usando-se coluna de gel filtração de 300 x 7,8 mm para partículas de 10 µm, com fluxo de *Fase móvel* de 0,3 mL/minuto. As colunas são mantidas a uma temperatura constante de 25 °C. A eluição é monitorada usando-se um detector refractométrico para análise de PRP.

Fase móvel: preparar solução de cloreto de sódio 0,2 M e trometamina 0,01 M. Homogeneizar e, se necessário, ajustar para o pH 7,0. Filtrar num filtro de membrana de 0,45 µm antes do uso.

Solução de PRP: preparar solução de PRP a 4 mg/mL em *Fase móvel*.

Injetar 100 µL de amostras da solução de polissacarídeo a cada 60 minutos.

Para análise dos dados, é necessária a determinação do volume de exclusão total (V_0) e do volume de inclusão total (V_t). O V_0 e o V_t são determinados, respectivamente, com dextrana com peso molecular próximo a $K_d = 0,3$ e azida sódica.

Os polissacarídeos contêm uma fração de alto peso molecular eluindo no volume morto. O volume de eluição desses polissacarídeos de alto peso molecular, também, pode ser usado para determinar o volume morto da coluna. Na determinação da distribuição de peso molecular, o valor de K_d é determinado pela equação:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{ou} \quad K_d = \frac{Rt(V_e) - Rt(V_0)}{Rt(V_t) - Rt(V_0)}$$

em que,

$Rt(V_e)$ = tempo de retenção do polissacarídeo analisado;

$Rt(V_0)$ = tempo de retenção de V_0 ;

$Rt(V_t)$ = tempo de retenção de V_t .

Para calcular a quantidade de polissacarídeo eluído a um $K_d \leq 0,30$, o volume de eluição correspondente a um $K_d = 0,30$ é determinado segundo a expressão:

$$V_e = [3,0(V_t - V_0)] + V_0$$

Com o valor de V_e , a porcentagem de polissacarídeo eluído a $K_d \leq 0,30$ é então determinada marcando esse valor no cromatograma e integrando a área sob o pico até esse ponto.

Um valor aceitável é estabelecido, especificamente, para o produto e cada partida de PRP deve cumprir com esse limite. Os limites para produtos aprovados, utilizando as fases estacionárias indicadas, são registrados, para informação, na **Tabela 1**.

O método de *Cromatografia líquida (5.2.17.4)* de detecção por espalhamento de luz também pode ser utilizado.

Outros métodos validados, como determinação do grau de polimerização ou do peso molecular médio e a dispersão das massas moleculares, podem substituir o teste para *Distribuição por tamanho molecular* descrito.

Concentração de PRP. A concentração de PRP é determinada por *Método imunológico (5.6)*, *Cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (5.2.17.3)* ou Ribose por espectrofotometria (Orcinol). Se for utilizado o teor de ribose, proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*.

Solução padrão de D-ribose: diluir *D-ribose* em água destilada para a obtenção de uma solução a 25 µg/mL. Distribuir e armazenar as alíquotas a -20 °C.

Solução A: pesar, com exatidão, cerca de 50 mg de cloreto de ferro hexa-hidratado e dissolver em 100 mL de ácido clorídrico concentrado.

Reagente de orcinol: pesar 375 mg de orcinol monoidratado e dissolver em 5 mL de álcool etílico a 96% (v/v). Adicionar à *Solução A* na proporção de 1:20 e homogeneizar.

O polissacarídeo Hib é um polímero de ribosil-ribitol-5-fosfato e pode ser quantificado medindo-se o teor de ribose. A determinação do teor de ribose baseia-se na medição espectrofotométrica da absorvância de um complexo de coloração verde, formado pela reação entre o *Reagente de orcinol* e a ribose nas subunidades do polímero. Dentro da faixa da análise, a absorvância é proporcional à concentração de ribose. Para a curva analítica, pipetar, para cada um de 5 tubos de ensaio, 0 µL, 100 µL, 200 µL, 300 µL e 400 µL de *Solução padrão de D-ribose*. Adicionar água destilada a cada um dos tubos até 400 µL. Para a análise, dissolver o polissacarídeo purificado para 0,05 mg/mL em água destilada e pipetar 400 µL da solução amostra para os tubos. Adicionar a cada tubo 800 µL de *Reagente de orcinol* e colocá-los a 100 °C por 20 minutos. Deixar esfriar à temperatura ambiente e ler a absorvância a 669 nm. Os teores de ribose das amostras obtidas da curva analítica são expressos em microgramas de ribose por mililitro *versus* a massa do polissacarídeo seco. Calcular o percentual (p/p) de D-ribose de acordo com a expressão:

$$\% \text{ D - ribose} = \frac{\text{massa de D - ribose } (\mu\text{g}) \text{ obtida da curva padrão}}{\text{massa de polissacarídeo } (\mu\text{g})} \times 100$$

O limite mínimo deve estar de acordo com o registro do produto aprovado pela autoridade regulatória nacional.

Fósforo. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*. O método pode ser baseado na medida espectrofotométrica da absorvância da coloração azul formada pela redução de um complexo fosfomolibdico pelo ácido ascórbico.

Solução padrão: dissolver 109,7 mg de fosfato de potássio monobásico em 250 mL de água destilada. Diluir 5 mL da solução anterior para 100 mL com água destilada.

Solução A: pesar 2,5 g de molibdato de amônio e adicionar 100 mL de água destilada.

Solução B: no momento do uso, pesar 10 g de ácido ascórbico e adicionar 100 mL de água destilada.

Solução C (Complexo fosfomolibdico e ácido ascórbico): no momento do uso, misturar as soluções na seguinte ordem: 1 volume de ácido sulfúrico 3 M, 1 volume de *Solução A*, 2 volumes de água destilada e 1 volume de *Solução B*.

Reativo de mineralização: 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 5 mL de ácido perclórico a 70% (p/p).

Dissolver 25 mg de polissacarídeo purificado em água destilada, transferir, quantitativamente, para balão volumétrico de 50 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar. Para a mineralização, pipetar 100 µL dessa solução, transferir para um tubo de ensaio e adicionar 100 µL de *Reativo de mineralização*. O teste é realizado em triplicata. Aquecer a 250 °C até que haja descoloração completa (quatro horas). O branco (1 mL de água destilada) e as soluções padrão (0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL e 2,0 mL de *Solução padrão*) são tratados de forma idêntica. Para o desenvolvimento de coloração, após esfriar cada tubo, adicionar 4 mL de *Solução C*. Aquecer o conteúdo dos tubos a 37 °C por 120 minutos para desenvolver uma coloração azul do complexo fosfomolibdico. Medir a absorvância das soluções amostras e padrões a 825 nm utilizando o branco como célula de referência. O teor de fósforo da amostra é determinado utilizando-se uma curva de

calibração estabelecida a partir dos valores obtidos para as soluções padrão. Calcular o porcentual de fósforo por meio da fórmula:

$$\% \text{ de fósforo} = \frac{\text{concentração da amostra obtida na curva padrão } (\mu\text{g/tubo})}{0,1 \times \text{concentração da amostra } (\mu\text{g de polissacarídeo seco/mL})} \times 100$$

Os limites devem estar de acordo com o registro do produto aprovado pela autoridade regulatória nacional.

Proteína. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*. O ensaio sugerido é baseado no método de Lowry, em que há desenvolvimento da coloração azul do quelato de cobre em presença de proteínas.

Solução estoque padrão de albumina de soro bovino: pesar 20 mg de albumina bovina (BSA) e completar para 100 mL com água destilada.

Solução alcalina de cobre: misturar 0,5 mL de tartarato de sódio e potássio a 2% (p/v) em água destilada, com 0,5 mL de sulfato cúprico penta-hidratado a 1% (p/v) em água destilada. Ajustar para 50 mL com carbonato de sódio a 2% (p/v) em hidróxido de sódio 0,1 M.

Reagente Folin diluído: misturar 50 mL de reagente fosfomolibdotúngstico (reagente de Folin-Ciocalteu-fenol) com 50 mL de água destilada. Essa solução tem de ser preparada no momento do uso.

Em tubos de ensaio adicionar 0 μL , 10 μL , 25 μL , 50 μL , 100 μL e 200 μL da *Solução estoque padrão de albumina de soro bovino*. Ajustar o volume em cada tubo para 200 μL com água destilada. Se necessário, diluir as amostras contendo cerca de 10 mg/mL de polissacarídeo dessecado e adicionar 200 μL em cada tubo. Adicionar 200 μL de água destilada como solução branco. Adicionar aos tubos de soluções padrão, branco e amostra na seguinte ordem: 1 mL de *Solução alcalina de cobre*, misturar e deixar reagir por 10 minutos; 100 μL de *Reagente Folin diluído*, misturando imediatamente. Após 30 minutos, as soluções são centrifugadas e as absorvâncias das soluções padrão e das soluções amostra são medidas a 750 nm. A concentração de proteína na amostra é expressa como microgramas por mililitro. Calcular a porcentagem de proteína de acordo com a expressão:

$$\% \text{ de proteína} = \frac{\text{concentração obtida da curva padrão } (\mu\text{g/tubo})}{\text{concentração da amostra } (\mu\text{g de polissacarídeo seco/mL})} \times 100$$

No máximo 1% (p/p), calculado em relação à base seca.

Ácido nucleico. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria no ultravioleta (5.2.14)*. O ácido nucleico residual de uma amostra contendo pelo menos 1 mg/mL de polissacarídeo dessecado é medido por espectrofotometria de absorção no ultravioleta em 260 nm. A absorvância de uma solução de ácido nucleico aquoso a 10 g/L em uma célula espectrofotométrica de 1 cm de largura a 260 nm é de 200.

$$\% \text{ de ácido nucleico} = \frac{\text{leitura da amostra} \times 50}{\text{massa de polissacarídeo seco (mg)}} \times 100$$

No máximo 1% (p/p), calculado em relação à base seca.

Reagentes residuais. Quando for relevante, devem ser realizados testes para determinar resíduos de reagentes utilizados durante a inativação e purificação. Um valor aceitável para cada reagente é estabelecido especificamente para o produto e cada partida de PRP deve cumprir com esse limite. Caso os métodos para remoção de um reagente residual tenham sido validados, o teste no PRP pode ser omitido.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo 10 UE/ μ g de PRP.

PROTEÍNA CARREADORA

A proteína carreadora, quando conjugada ao PRP, deve ser capaz de induzir uma atividade imunogênica adequada. As proteínas são produzidas por meio da cultura dos respectivos microrganismos, na qual é verificada a pureza bacteriana. O cultivo pode ser inativado e a proteína é purificada por métodos adequados. As proteínas aprovadas e seus respectivos métodos de conjugação são informados na **Tabela 1**.

Componente diftérico. A anatoxina diftérica é produzida como descrito na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*. Cumpre com os requisitos para anatoxina diftérica purificada, exceto para o teste de esterilidade, o qual não é requerido.

Componente tetânico. A anatoxina tetânica é produzida como descrito na monografia de *Toxoide tetânico adsorvido*. Cumpre com os requisitos para anatoxina tetânica purificada, exceto para o teste de esterilidade, o qual não é requerido.

Proteína diftérica CRM 197. Contém, no mínimo, 90% de proteína diftérica CRM 197, determinada por um método adequado. Alguns testes devem ser realizados, para validação ou rotineiramente, para demonstrar ausência de toxicidade no produto.

A proteína a ser utilizada na conjugação deve cumprir com os seguintes requisitos.

No caso de se utilizar como proteína carreadora o complexo proteico da membrana externa de *Neisseria meningitidis* grupo B (OMP), proceder ao *Teste para avaliação de pirogênios (5.5.2.7)*. Nos casos em que o *Teste de pirogênios em coelhos (5.5.2.7.2)* for permitido, injetar em cada coelho 0,25 μ g de OMP por quilograma de peso corpóreo.

Tabela 1 – Características do produto e especificações para o PRP e proteína carreadora.

Tipo	Carreador		Polissacarídeo <i>Haemophilus</i>		Conjugação	
	Pureza	Quantidade nominal por dose	Tipo de PRP	Quantidade nominal por dose	Método de conjugação	Procedimento
Anatoxina Diftérica	Maior do que 1500 Lf/mg de nitrogênio	18 μ g	PRP de peso reduzido Kd:0,6-0,7	25 μ g	Ativação do PRP por brometo de cianogênio	Anatoxina diftérica ativada (D-AH ⁺), ativação do PRP por brometo de cianogênio PRP ativado-HA (PRP-cov.-HA) + Anatoxina Tetânica + EDAC
Anatoxina Tetânica	Maior do que 1500 Lf/mg de nitrogênio	20 μ g	PRP \geq 50% Kd \leq 0,30	10 μ g	Mediada por carbodiimida	

Proteína Diftérica CRM 197	Maior do que 90% de proteína diftérica	25 µg	PRP de peso reduzido Dp=15-35 ou 10-35	10 µg	Aminação redutora (método de 1 passo) ou ativação por N-hidroxisuccinimida	Conjugação direta do PRP com a proteína CRM 197 ativação cianoborohidrida
Membrana proteica externa de Meningococos grupo B (OMP)	Vesículas proteicas da membrana externa: ≤ 8% de lipopolissacarídeo	125 µg ou 250 µg	PRP de peso reduzido Kd ≤ 0,6, usando agarose de ligação cruzada para cromatografia R ou M _w > 50 x 10 ³	7,5 ou 15 µg	Ligação tioéter	Ativação do PRP por CDI PRP-IM + BuA2 + BrAc = PRP-BuA2-BrAc + OMP tioativada

O PRP é modificado quimicamente para possibilitar a conjugação, sendo parcialmente despolimerizado antes ou após o procedimento. Antes da conjugação, grupos funcionais ativos podem ser introduzidos na proteína ou no PRP. Para determinar a consistência, a extensão da derivação é monitorada nessa etapa da produção. O conjugado é obtido pela ligação covalente de PRP e proteína. Os grupos funcionais residuais não reativos, mas potencialmente reatogênicos, podem estar presentes após o processo de conjugação. O processo deve ser validado para comprovar que grupos funcionais reativos não permanecem após a produção. O conjugado é então purificado para remoção de reagentes e submetido aos controles relacionados a seguir. Os limites aplicados para alguns desses controles estão listados na **Tabela 2**. Para uma vacina liofilizada, que é submetida ao processo de liofilização que pode afetar o componente a ser analisado, alguns testes podem ser realizados no lote final.

Concentração de PRP. A concentração de PRP é determinada por *Método imunoquímico (5.6)*, *Cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (5.2.17.3)* ou *Ribose*. Quando o teor de polissacarídeo for determinado pela concentração de ribose, proceder conforme descrito em *Concentração de PRP*, em *Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*. O teor de polissacarídeo é calculado multiplicando-se o teor de ribose, expresso em micrograma por mililitro, pelo fator 2,488.

Proteína livre. A concentração pode ser determinada diretamente por um método adequado ou por derivação, por meio do cálculo dos resultados de outros testes. O valor deve estar dentro dos limites aprovados para o produto.

Proteína. Proceder conforme descrito em *Proteína*, em *Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*. O resultado é calculado em microgramas por mililitro.

Razão polissacarídeo/proteína. Quociente entre concentração de polissacarídeo e concentração proteica. Para cada conjugado, a relação deve estar de acordo com a faixa aprovada no registro do produto aprovado pela autoridade regulatória nacional.

Reagentes residuais. A remoção de reagentes residuais tais como: cianeto, EDAC (etildimetilaminopropilcarbodiimida) e fenol, é confirmada por testes adequados ou por validação do processo.

Distribuição por tamanho molecular. Proceder conforme descrito em *Distribuição por tamanho molecular*, em *Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*.

Para calcular a quantidade do conjugado eluído a um $K_d \leq 0,20$, o volume de eluição correspondente a um $K_d = 0,20$ é determinado segundo a expressão:

$$V_e = [0,2(V_t - V_o)] + V_o$$

Com o valor de V_e , a porcentagem de polissacarídeo eluído a $K_d \leq 0,20$ é então determinada, marcando esse valor no cromatograma e integrando a área sob o pico até esse ponto.

Para o conjugado, o valor aceitável deve estar de acordo com o registro do produto aprovado pela autoridade regulatória nacional.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste. Utilizar para cada meio de cultivo 10 mL ou o equivalente a 100 doses, o que for menor.

Tabela 2 – Requisitos para o conjugado a granel.

<i>Teste</i>	<i>Proteína carreadora</i>			
	<i>Anatoxina diftérica</i>	<i>Anatoxina tetânica</i>	<i>Proteína diftérica CRM 197</i>	<i>Membrana proteica externa de Meningococo grupo B (OMP)</i>
PRP livre	< 37%	< 20%	< 25%	< 15%
Proteína livre	< 4%	< 1%	< 1% ou < 2%, dependendo do método de conjugação	Não aplicável
Razão PRP/ Proteína	1,25 – 1,8	0,30 – 0,6	0,3 – 0,7	0,05 – 0,1
Peso molecular (Kd):		$\geq 80\%$ para $K_d \leq 0,20$		
agarose de ligação cruzada para cromatografia	95% < 0,75	60% < 0,2	50%	85% < 0,3
agarose de ligação cruzada para cromatografia	0,6 – 0,7	85% < 0,5	0,3 – 0,6	

No preparo da vacina, produto acabado a granel, pode ser adicionado um adjuvante, um conservante antimicrobiano e um estabilizador, antes da diluição final com diluente adequado. Antes do envase, amostras do produto são submetidas aos controles a seguir.

Timerosal. Quando aplicável, proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

O produto é envasado em recipientes adequados e, se for o caso, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

O teste deve ser realizado por um *Método imunológico (5.6)* aprovado, utilizando anticorpos específicos para o polissacarídeo purificado.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra da vacina ou, no caso do componente liofilizado, o pH deve ser determinado após a reconstituição com o diluente adequado. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 3,0%.

Concentração de Polissacarídeo. A concentração de PRP é determinada por *Método imunológico (5.6)*, *Cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (5.2.17.3)* ou Ribose por espectrofotometria (Orcinol). Se for utilizado o teor de ribose, proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*. Para vacina liofilizada, dissolver o conteúdo de 20 frascos em cerca de 4 mL de água destilada e remover a lactose por diálise. Diluir o líquido dialisado residual a 10 mL com água destilada e determinar o teor de ribose da vacina conforme descrito em *Concentração de PRP, em Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*. O teor de PRP da vacina é calculado multiplicando-se o teor de ribose, expresso como micrograma por mililitro, por 2,488 e é, no mínimo, 80% da concentração declarada no rótulo.

Distribuição por tamanho molecular. É a porcentagem de PRP, eluído antes de um dado valor Kd ou dentro de uma faixa de valores Kd, determinada por *Cromatografia líquida de alta eficiência (5.2.17.4)* de exclusão por tamanho, conforme descrito em *Distribuição por tamanho molecular, para o Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*. Para um lote de vacina, uma amostra de 5 doses da vacina é diluída em 2,5 mL de *Fase móvel*. Um valor aceitável é estabelecido, especificamente, para o produto e cada lote de vacina deve cumprir com esse limite. Os limites para produtos aprovados, utilizando as fases estacionárias indicadas, são listados, para informação, na **Tabela 2**.

Polissacarídeo livre. No máximo 20%. A concentração de PRP livre é determinada após a remoção do conjugado por formação de um complexo PRP-proteína carreadora-anticorpo ou por outros métodos validados. Verificar no sobrenadante, por *Método imunológico (5.6)*, o teor de polissacarídeo de Hib e a ausência de conjugado. Calcular a porcentagem de polissacarídeos livres na vacina segundo a expressão:

$$\% \text{ de PRP livre} = \frac{\text{teor de PRP do sobrenadante}}{\text{teor total de PRP da vacina}} \times 100$$

Timerosal. Quando aplicável, proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). Cumpre o teste. No máximo 25 UE/dose. Caso a vacina contenha algum componente que possa interferir no ensaio, deve ser realizado o *Teste para avaliação de pirogênios (5.5.2.7)*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpre o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA HEPATITE B (RECOMBINANTE)

Vaccinum hepatitis B ADN recombinatum

A vacina contra hepatite B recombinante é uma suspensão de antígeno (HBsAg) purificado da superfície do vírus da hepatite B, adsorvido pelo hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, podendo conter conservante. Está, também, presente o gene S ou combinação dos genes S e pré-S2 ou dos genes S, pré-S2 e pré-S1. Tem o aspecto de suspensão opalescente que não apresenta grumos ou partículas estranhas.

A vacina é produzida pela expressão do gene viral codificado para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) em cepa recombinante de leveduras ou em cultura de células suscetíveis. O antígeno produzido cumpre os testes de esterilidade, retenção de plasmídeo e consistência antigênica. No caso de utilização de cultura de células de mamíferos, o antígeno produzido tem que demonstrar ausência de micoplasmas e vírus. Além disso, as células (célula hospedeira em combinação com o vetor de expressão do antígeno) utilizadas na produção são necessariamente procedentes de banco de células aprovado pela autoridade regulatória nacional.

O antígeno de superfície recombinante (HBsAg) é purificado por vários métodos físico-químicos e formulado em gel de hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio. Os controles citados a seguir são pré-requisitos para a formulação da vacina.

ADN residual. No máximo 100 pg/dose individual humana.

Proteínas. Determinadas por método apropriado.

Concentração antigênica. Avaliada por método imunológico validado.

Identificação. Avaliada por método imunológico validado.

Pureza. Determinada por comparação com vacina de referência utilizando método adequado como cromatografia líquida ou SDS-PAGE. Apresenta, no mínimo, 95% de proteínas do antígeno de superfície do vírus da hepatite B.

Íons inorgânicos. Os resíduos de íons inorgânicos, provenientes de sais utilizados no processo de produção, são determinados por métodos adequados.

Esterilidade. Cumpre o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

Soro animal. Se é utilizado soro de origem animal nos processos de produção, o resíduo de soro não é superior a 1 µL/L de vacina.

Outros componentes. Proteínas, lipídeos, ácido nucleico e carboidratos, também são determinados.

Antes do envase o produto é submetido a controles de adjuvante, conservante e esterilidade.

A vacina é envasada em recipientes adequados, rotulada e submetida aos controles requeridos.

Outras informações relativas à produção e seus controles estão indicadas na monografia de *Vacinas para uso humano*.

IDENTIFICAÇÃO

O *Doseamento* pode ser utilizado.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Alumínio. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 1,25 mg/dose individual humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Timerosal. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

Teste para avaliação de pirogênios (5.5.2.7). Cumpre o teste.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo 10 UE/mL.

DOSEAMENTO

Preparar, no mínimo, três diluições da vacina e de uma vacina de referência em solução isotônica de cloreto de sódio, contendo o adjuvante de alumínio utilizado na vacina. Cada diluição é inoculada por via intraperitoneal, em pelo menos, 10 camundongos BALB/c de haplotipo H-2^q ou H-2^d. Um grupo de animais é inoculado somente com o diluente. Os animais utilizados devem ter o mesmo sexo. Após quatro a seis semanas da inoculação, anestésiar e sangrar todos os animais. Separar individualmente os soros e determinar a presença de anticorpos para o vírus da hepatite B por método imunoenzimático. Registrar o número de animais que demonstram soroconversão em cada diluição e calcular a DE₅₀ (dose efetiva 50%), assim como a potência relativa por um método estatístico adequado. O ensaio é considerado válido se (a) a DE₅₀ encontrada estiver entre a menor e a maior concentração de vacina inoculada nos camundongos; (b) a análise estatística não demonstrar desvio de linearidade e paralelismo; (c) o limite de confiança da potência relativa estiver entre 30% e 300%.

O limite de confiança superior da potência relativa é, no mínimo, 1.

Métodos *in vitro* validados, tais como ensaio imunoenzimático e radio-imunoensaio, utilizando anticorpos monoclonais específicos para antígeno HBsAg, também podem ser utilizados.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA INFLUENZA (ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE, INATIVADA)

Vaccinum influenzae inactivatum ex corticis antigeniis praeparatum

A vacina influenza (antígeno de superfície, inativada) é uma suspensão de antígenos do vírus da gripe composta por diferentes cepas do vírus *influenza*, fracionado e purificado, cuja composição é atualizada a cada ano. É apresentada como suspensão aquosa homogênea e levemente opalescente se estiver adicionada de um adjuvante.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) avalia mundialmente as evidências epidemiológicas da influenza e recomenda as cepas que devem compor a vacina.

A produção da vacina é baseada no sistema de lote-semente primário, do qual se origina o lote-semente secundário ou de trabalho por meio de passagens em ovos embrionados de galinha SPF (livre de micro-organismos contaminantes) ou em células suscetíveis. O lote de trabalho deve ser avaliado quanto à esterilidade e micoplasmas. Além disso, a cepa viral tem que demonstrar imunogenicidade adequada e segurança para o ser humano.

A replicação do vírus pode ser realizada por inoculação na cavidade alantoide de ovos embrionados de galinha, livre de patógenos específicos, ou em cultura de células suscetíveis, provenientes de uma criação reconhecidamente sadia. Se a produção da vacina ocorrer em ovos embrionados, 2% e no mínimo 20 ovos são separados para controle. Ao final da produção da vacina, esses ovos não-infectados com a cepa vacinal têm que demonstrar ausência de patógenos específicos para aves.

O líquido alantoide é recolhido dos ovos após um período de incubação a uma temperatura que favoreça a replicação de cada cepa viral. As suspensões de cada tipo de vírus são coletadas e processadas separadamente. Em seguida, elas são tratadas por um processo de reconhecida eficácia que permita inativar o vírus sem alterar sua imunogenicidade.

As partículas virais são purificadas por centrifugação ou outro processo estabelecido e fragmentadas em subunidades por meio de procedimentos aprovados. Posteriormente, devem ser submetidas a uma purificação complementar e a suspensão monovalente resultante pode conter um agente antimicrobiano adequado.

As suspensões monovalentes são submetidas aos controles requeridos antes de ser preparado o produto a granel.

Inativação viral. Proceder conforme descrito em *Inativação viral*, em *Ensaio de segurança biológica*.

Antígeno hemaglutinina. A determinação do teor de hemaglutinina é baseada na reação *in vitro* de antígeno-anticorpo por *Imunodifusão radial simples* (5.6).

Antígeno neuraminidase. Detectar o tipo de antígeno neuraminidase por métodos enzimáticos ou imunológicos.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Agentes de fragmentação e purificação. Realizar determinação da concentração residual dos agentes de fragmentação e purificação utilizados, por meio de método adequado e validado. O limite máximo deve ser aprovado pela autoridade regulatória nacional no registro do produto.

Pureza. Utilizar *Eletroforese em gel de poliacrilamida*, conforme descrito em *Eletroforese (5.2.22)*, ou outro método aprovado. Devem ser detectados predominantemente antígenos de hemaglutinina e neuraminidase.

Quantidades estabelecidas dos produtos monovalentes são misturadas de modo a originar o produto acabado a granel, que só poderá ser envasado quando aprovado nos testes de controle de qualidade.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Timerosal. Proceder conforme descrito na monografia *Vacinas para uso humano*.

O produto é envasado em recipientes adequados, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

Proceder conforme descrito em *Imunodifusão radial simples (5.6)* ou em outro *Método imunoquímico (5.6)*, utilizando soros específicos dos componentes virais.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Cumpre o teste. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proteína total (5.3.3.2). Cumpre o teste. No máximo 40 µg por cepa viral e 120 µg por dose humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Timerosal. Proceder conforme descrito na monografia *Vacinas para uso humano*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Agente de inativação. Realizar determinação da concentração residual do agente de inativação viral por meio de método adequado e validado. Se forem utilizadas soluções de formaldeído ou betapropiolactona, os limites máximos devem ser de, respectivamente, 200 ppm e 0,1% (v/v). É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Adjuvante. Determinar o teor da substância utilizada como adjuvante por método validado e aprovado pela autoridade regulatória nacional. A concentração deve estar na faixa que demonstrou ser efetiva em estudos clínicos. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). Cumpre o teste. No máximo 100 UE por dose humana.

Ovoalbumina. Determinar o teor de ovoalbumina por *Método imunoquímico (5.6)* adequado, utilizando como referência uma preparação padrão de ovoalbumina. No máximo 1µg por dose humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes dos envase.

Inativação viral. Inocular 0,2 mL da amostra na cavidade alantoide de cada um de, pelo menos, 10 ovos embrionados de galinha. Após incubação à temperatura 33-37 °C por três dias devem sobreviver pelo menos 80% dos embriões. Coletar de cada ovo contendo embrião sobrevivente cerca de 1,0 mL de líquido alantoide e misturá-los. Inocular 0,2 mL da mistura em cada um de 10 ovos embrionados e incubar a 33-37 °C por três dias. Coletar cerca de 1 mL do líquido alantoide de cada ovo e realizar individualmente um teste de hemaglutinação para detectar hemaglutininas decorrentes de crescimento viral. Não deve haver reação positiva no líquido alantoide em qualquer uma das séries de diluição.

DOSEAMENTO

Conteúdo de hemaglutinina

A determinação do teor de hemaglutinina é baseada na reação *in vitro* de antígeno-anticorpo por *Imunodifusão radial simples* (5.6).

Preparar um gel de ágar a 1% (p/v) contendo soro anti-hemaglutinina específico para a cepa em teste e distribuir 27 mL em uma placa de vidro ou em filme plástico com superfície hidrofílica de 12 cm x 12 cm. Após pelo menos duas horas à temperatura de 2 °C a 8 °C em câmara úmida, perfurar no gel 49 cavidades equidistantes de 4 mm de diâmetro.

Tratar a amostra em teste e a hemaglutinina de referência com detergente zwitteriônico, sob agitação, por 30 minutos. Preparar uma série de três diluições, em triplicata, da hemaglutinina de referência e da amostra em teste. Preencher aleatoriamente os orifícios com 20 µL das soluções de antígeno e da amostra em teste. Incubar em câmara úmida à temperatura de 20 °C a 25 °C por 16 a 20 horas, sobre uma superfície perfeitamente nivelada. Lavar com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) e secar as placas. Proceder à coloração com azul de Coomassie a 0,15% (p/v) ou com outro corante adequado. Medir os diâmetros perpendiculares dos halos de precipitação para cada um dos orifícios com o auxílio de lupa graduada ou outro método adequado. Calcular o teor de hemaglutinina pela comparação entre as curvas do diâmetro médio para cada diluição da amostra em teste e do antígeno de referência, utilizando método de regressão múltipla ou outro método estatístico adequado. No mínimo, 15 µg.

O teste será considerado válido se o intervalo de confiança ($P = 0,95$) estiver compreendido entre 80 e 125% da concentração de hemaglutinina estimada para cada cepa. O limite inferior do intervalo de confiança ($P = 0,95$) é, no mínimo, 80% da concentração nominal declarada para cada cepa.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA INFLUENZA (FRAGMENTADA, INATIVADA)

Vaccinum influenzae inactivatum ex virorum fragmentis praeparatum

A vacina influenza (fragmentada, inativada) é uma suspensão de antígenos do vírus da gripe composta por diferentes cepas do vírus *influenza*, fracionado e purificado, cuja composição é atualizada a cada ano. É apresentada como suspensão aquosa homogênea e levemente opalescente se estiver adicionada de um adjuvante.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) avalia mundialmente as evidências epidemiológicas da influenza e recomenda as cepas que devem compor a vacina.

A produção da vacina é baseada no sistema de lote-semente primário, do qual se origina o lote-semente secundário ou de trabalho por meio de passagens em ovos embrionados de galinha SPF (livre de micro-organismos contaminantes) ou em células suscetíveis. O lote de trabalho deve ser avaliado quanto à esterilidade e micoplasmas. Além disso, a cepa viral tem que demonstrar imunogenicidade adequada e segurança para o ser humano.

A replicação do vírus pode ser realizada por inoculação na cavidade alantoide de ovos embrionados de galinha, livre de patógenos específicos, ou em cultura de células suscetíveis, provenientes de uma criação reconhecidamente sadia. Se a produção da vacina ocorrer em ovos embrionados, 2% e, no mínimo, 20 ovos são separados para controle. Ao final da produção da vacina, estes ovos não-infectados com a cepa vacinal têm que demonstrar ausência de patógenos específicos para aves.

O líquido alantoide é recolhido dos ovos após um período de incubação a uma temperatura que favoreça a replicação de cada cepa viral. As suspensões de cada tipo de vírus são recolhidas e processadas separadamente. Em seguida elas são tratadas por um processo de reconhecida eficácia que permita inativar o vírus sem alterar sua imunogenicidade. O vírus é purificado por centrifugação ou por outro processo estabelecido e, posteriormente, fragmentado por meio de agentes tensoativos adequados. As partículas fragmentadas são adicionadas em suspensão que pode conter um agente antimicrobiano adequado.

As suspensões monovalentes são submetidas aos controles requeridos antes de ser preparado o produto a granel.

Inativação viral. Proceder conforme descrito em *Inativação viral em Testes de segurança biológica*.

Antígeno hemaglutinina. A determinação do teor de hemaglutinina é baseada na reação *in vitro* de antígeno-anticorpo por *Imunodifusão radial simples (5.6)*.

Antígeno neuraminidase. Detectar o tipo de antígeno neuraminidase por métodos enzimáticos ou imunológicos.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Agentes de fragmentação e purificação. Realizar determinação da concentração residual dos agentes de fragmentação e purificação utilizados, por meio de método adequado e validado. O limite máximo deve ser aprovado pela autoridade regulatória nacional no registro do produto.

Quantidades estabelecidas dos produtos monovalentes são misturadas de modo a originar o produto acabado a granel, que só poderá ser envasado quando aprovado nos testes de controle de qualidade.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Timerosal. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

O produto é envasado em recipientes adequados, rotulado e submetido aos controles requeridos.

Outras informações relativas aos critérios de produção e seus controles estão indicados na monografia de *Vacinas para uso humano*.

IDENTIFICAÇÃO

Proceder ao ensaio de *Imunodifusão radial simples* ou outro *Método imunoquímico (5.6)*, utilizando soros específicos dos componentes virais.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Cumpre o teste. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proteína total (5.3.3.2). Cumpre o teste. No máximo 100 µg por cepa viral e 300 µg por dose humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Timerosal. Proceder conforme descrito na monografia *Vacinas para uso humano*. O limite deve ser determinado pelo histórico da eficácia no registro do produto e não pode ultrapassar 115% do valor declarado na composição da vacina. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Agente de inativação. Realizar determinação da concentração residual do agente de inativação viral por meio de método adequado e validado. Se forem utilizadas soluções de formaldeído ou betapropiolactona, os limites máximos devem ser de, respectivamente, 200 ppm e 0,1% (v/v). É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Adjuvante. Determinar o teor da substância utilizada como adjuvante por método validado e aprovado pela Autoridade Regulatória Nacional. A concentração deve estar na faixa que se demonstrou ser efetiva em estudos clínicos. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). Cumpre o teste. No máximo 100 UE por dose humana.

Ovoalbumina. Determinar o teor de ovoalbumina por *Método imunoquímico (5.6)* adequado, utilizando como referência uma preparação padrão de ovoalbumina. No máximo 1µg por dose humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes dos envase.

Inativação viral. Inocular 0,2 mL da amostra na cavidade alantoide de cada um de, pelo menos, 10 ovos embrionados de galinha. Após incubação à temperatura 33-37 °C por 3 dias, pelo menos 80% dos embriões devem sobreviver. Coletar de cada ovo contendo embrião sobrevivente cerca de 1,0 mL

de líquido alantoide e misturá-los. Inocular 0,2 mL da mistura em cada um de 10 ovos embrionados e incubar a 33-37 °C por 3 dias. Coletar cerca de 1 mL do líquido alantoide de cada ovo e realizar individualmente um teste de hemaglutinação para detectar hemaglutininas decorrentes de crescimento viral. Não deve haver reação positiva no líquido alantoide em qualquer uma das séries de diluição.

DOSEAMENTO

Conteúdo de hemaglutinina. A determinação do teor de hemaglutinina é baseada na reação *in vitro* de antígeno-anticorpo por *Imunodifusão radial simples* (5.6).

Preparar um gel de ágar a 1% (p/v) contendo soro anti-hemaglutinina específico para a cepa em teste e distribuir 27 mL em uma placa de vidro ou em filme plástico com superfície hidrofílica de 12 cm x 12 cm. Após pelo menos duas horas à temperatura de 2 °C a 8 °C em câmara úmida, perfurar no gel 49 cavidades equidistantes de 4 mm de diâmetro.

Tratar a amostra em teste e a hemaglutinina de referência com detergente zwitteriônico, sob agitação, por 30 minutos. Preparar uma série de três diluições, em triplicata, da hemaglutinina de referência e da amostra em teste. Preencher aleatoriamente os orifícios com 20 µL das soluções de antígeno e da amostra em teste. Incubar em câmara úmida à temperatura de 20 °C a 25 °C por 16 a 20 horas, sobre uma superfície perfeitamente nivelada. Lavar com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) e secar as placas. Proceder à coloração com azul de Coomassie a 0,15% (p/v) ou com outro corante adequado. Medir os diâmetros perpendiculares dos halos de precipitação para cada um dos orifícios com o auxílio de lupa graduada ou outro método adequado. Calcular o teor de hemaglutinina pela comparação entre as curvas do diâmetro médio para cada diluição da amostra em teste e do antígeno de referência, utilizando método de regressão múltipla ou outro método estatístico adequado. No mínimo 15 µg.

O teste será considerado válido se o intervalo de confiança ($P = 0,95$) estiver compreendido entre 80 e 125% da concentração de hemaglutinina estimada para cada cepa. O limite inferior do intervalo de confiança ($P = 0,95$) é, no mínimo, 80% da concentração nominal declarada para cada cepa.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA MENINGOCÓCICA ACWY (POLISSACARÍDICA)

Vaccinum meningococcale polysaccharidicum

A vacina meningocócica ACWY (polissacarídica) é uma preparação liofilizada de um ou mais polissacarídeos capsulares purificados, obtida a partir de uma ou mais cepas de *Neisseria meningitidis* grupos A, C, Y e W₁₃₅, capazes de produzir polissacarídeos.

O polissacarídeo meningocócico grupo A consiste de unidades repetidas, parcialmente acetiladas, de N-acetil manosamina unidas por ligações fosfodiéster 1 α →6.

O polissacarídeo meningocócico grupo C consiste de unidades repetidas parcialmente acetiladas do ácido N-acetilneuramínico, unidas por ligações glicosídicas 2 α →9.

O polissacarídeo meningocócico grupo Y consiste de unidades alternadas de ácido siálico e glicose, parcialmente O-acetiladas, unidas por ligações glicosídicas 2 α →6 e 1 α →4.

O polissacarídeo meningocócico grupo W₁₃₅ consiste de unidades alternadas de ácido siálico e galactose, parcialmente O-acetiladas, unidas por ligações glicosídicas 2 α →6 e 1 α →4.

O componente ou componentes devem ser estabelecidos no rótulo da vacina, juntamente com íons de cálcio e a umidade residual, representando mais de 90% da massa do produto.

A produção dos polissacarídeos meningocócicos é baseada no sistema de lote semente, que é uma quantidade de ampolas mantidas a -70 °C contendo *N. meningitidis*, de composição uniforme, obtido a partir de uma cepa liofilizada de procedência conhecida. As informações relativas à cepa devem incluir características bioquímicas e sorológicas. Os meios de cultura sólidos e líquidos utilizados, respectivamente, para preservar a viabilidade da cepa e nos cultivos de produção devem ser isentos de proteínas de origem animal. A pureza da cultura deve ser avaliada pela morfologia das colônias, exame microscópico, inoculação da amostra em meios de cultivo adequados e aglutinação da cultura com antissoro específico.

O método de produção deve resultar em vacinas meningocócicas polissacarídicas com capacidade imunogênica e isenta de toxicidade.

Os polissacarídeos são purificados por meio de procedimentos efetivos na remoção de ácidos nucleicos, proteínas e lipopolissacarídeos.

A etapa final de purificação consiste de precipitação dos polissacarídeos por álcool etílico, secagem e armazenamento a -20 °C. A perda no processo de secagem é determinada por termogravimetria e o valor obtido é utilizado para calcular os resultados de outros testes físico-químicos com referência à base seca.

Somente os polissacarídeos purificados que cumprirem os requisitos a seguir podem ser utilizados na preparação da vacina produto à granel.

Identificação. O teste de identificação deve ser realizado por um *Método imunoquímico (5.6)* aprovado, utilizando anticorpos específicos para cada grupo de polissacarídeos.

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 20%.

Proteína. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria no visível (5.2.14)*.

Solução padrão estoque de BSA 0,02% (albumina sérica bovina): pesar 20 mg de albumina sérica bovina e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com água destilada.

Solução A: dissolver 2 g de carbonato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 M, transferir, quantitativamente, para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com o hidróxido de sódio 0,1 M e homogeneizar

Solução B: dissolver 1 g de sulfato de cobre penta-hidratado (CuSO₄.5H₂O) em água destilada, transferir, quantitativamente, para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar.

Solução C: dissolver 2 g de tartarato de sódio/potássio em água destilada, transferir, quantitativamente, para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar. Preparar essa solução no momento do uso.

Solução alcalina de cobre: misturar com agitação 0,5 mL da *Solução B* e 0,5 mL da *Solução C*, completar para 50 mL com a *Solução A* e homogeneizar.

Pipetar para tubos de ensaio os volumes de *Solução padrão estoque de BSA 0,02% (albumina sérica bovina)* e água destilada, descritos na **Tabela 1**, para construção da curva analítica:

Tabela 1 – Valores de concentração e volume de solução padrão estoque de BSA e volume de água destilada usados no teste.

<i>Concentração de BSA (µg/mL)</i>	<i>Volume de BSA estoque (µL)</i>	<i>Volume de água destilada (µL)</i>
10	10	190
25	25	175
50	50	150
100	100	100
150	150	50
200	200	---

Diluir a amostra para aproximadamente 10 mg de polissacarídeo seco por mililitro. Retirar três alíquotas de 200 µL da solução da amostra. Preparar o ensaio em branco com 200 µL de água destilada. Adicionar ao branco, padrões e amostras 1 mL de *Solução alcalina de cobre*. Homogeneizar e aguardar 10 minutos. Adicionar 100 µL de reagente fosfomolibdotúngstico (reagente de Folin-Ciocalteu-fenol) 2 M diluído em água destilada na proporção 1:1. Homogeneizar imediatamente e aguardar 30 minutos. Caso seja observada turvação, centrifugar as amostras e fazer a leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 750 nm. Traçar a curva analítica, concentração de BSA (µg/mL) *versus* leituras de absorvância, com os resultados obtidos nas diversas diluições e calcular, por meio dela, a concentração de proteína na amostra em microgramas por mililitro.

Calcular o percentual de proteína residual, segundo a expressão:

$$\% \text{proteína} = \frac{C_p}{C_a} \times 100$$

em que,

C_p = concentração obtida da curva analítica (µg/mL);

C_a = concentração da amostra (µg polissacarídeo seco/mL).

No máximo 1% (p/p) de proteína no polissacarídeo, calculada em relação à base seca.

Fenol residual. Diluir a amostra para aproximadamente 10 mg de polissacarídeo seco por mililitro. Para um tubo de ensaio, transferir uma gota dessa solução e, em outro tubo, fazer um controle positivo transferindo uma gota da *Solução padrão de fenol*. Transferir para os tubos os seguintes reagentes: cinco gotas de água destilada; uma gota de *Tampão alcalino pH 9,8*; uma gota da *Solução de 4-aminoantipirina*; uma gota da *Solução de ferricianeto de potássio* e uma gota de *Fosfato monopotássico M*. Não deverá desenvolver coloração vermelho sangue. Não deve ser detectado fenol.

Solução A: pesar 0,05 g de fenol (congelado) e completar o volume para 1000 mL com água destilada.

Solução padrão de fenol: retirar uma alíquota de 20 mL da *Solução A* estoque e completar o volume para 1000 mL com água destilada.

Tampão alcalino pH 9,8: pesar 6,36 g de carbonato de sódio anidro e 3,36 g de bicarbonato de sódio, solubilizar em água, transferir, quantitativamente, para um balão volumétrico de 1000 mL, completar o volume e homogeneizar. O pH deverá ser de 9,8. Conservar em geladeira ao abrigo da luz.

Solução de 4-aminoantipirina: pesar 3 g de 4-aminoantipirina, solubilizar em água, transferir, quantitativamente, para balão volumétrico de 1000 mL, adicionar água destilada até completar o volume e homogeneizar. A solução deverá ser preparada no momento do uso.

Solução de ferricianeto de potássio: pesar 12 g de ferricianeto de potássio, solubilizar em água, transferir, quantitativamente, para balão volumétrico de 1000 mL, adicionar água destilada até completar o volume e homogeneizar. Conservar em geladeira ao abrigo da luz.

Solução de fosfato de potássio monobásico M: pesar 136 g de fosfato de potássio monobásico, solubilizar em água destilada, transferir, quantitativamente, para balão volumétrico de 1000 mL, adicionar água destilada até completar o volume e homogeneizar.

Ácido nucleico. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria ultravioleta (5.2.14)*. Diluir a amostra em balão volumétrico de 10 mL para uma concentração de aproximadamente 10 mg de polissacarídeo seco por mililitro. Medir a absorvância da solução resultante em 260 nm, utilizando água destilada para ajuste do zero. Calcular o percentual de ácido nucleico segundo a expressão:

$$\% \text{ÁcNu} = \frac{La}{m} \times 50$$

em que,

%ÁcNu = % de ácidos nucleicos;

La = leitura da amostra;

m = massa do polissacarídeo seco (mg).

No máximo 1% (p/p) do polissacarídeo, calculado em relação à base seca.

Distribuição por tamanho molecular. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)* de exclusão por tamanho. Pesar 5 mg de polissacarídeo, transferir para microtubo de polipropileno de 1 mL e dissolver em 1 mL de *Fase móvel*. Equilibrar o sistema de cromatografia a líquido através da passagem da *Fase móvel* por uma coluna de gel filtração de matriz polimérica hidrofílica de 300 x 7,8 mm para partículas de 10 µm, a uma velocidade de fluxo de 0,8 mL/minuto, até

a obtenção de uma linha estável em temperatura constante de 40 °C. Injetar 50 µL dos *Marcadores* de V_0 e V_t da coluna e das amostras. Verificar os tempos de retenção dos *Marcadores* e calcular o V_e da amostra, segundo a expressão:

$$V_e = Kd \times (V_t - V_0) + V_0$$

em que,

V_e = volume de eluição;

Kd = coeficiente de distribuição;

V_t = volume de eluição do marcador de V_t ;

V_0 = volume de eluição do marcador de V_0 .

Realizar o cálculo da área correspondente ao volume de eluição (V_e) utilizando Kd igual 0,5. No mínimo 65% do polissacarídeo do grupo A, 75% do polissacarídeo do grupo C e 80% dos polissacarídeos grupos Y e W₁₃₅, respectivamente, deve ser eluída antes de se atingir um Kd igual a 0,5.

Fase móvel: misturar 1220 mL da *Solução A* com 780 mL da *Solução B*, verificar o pH e ajustá-lo para 7,0. Adicionar acetonitrila, de forma que ela esteja presente a uma concentração final de 15% (v/v).

Solução A: pesar 39,749 g de fosfato de sódio dibásico e completar o volume para 1400 mL com água destilada.

Solução B: pesar 22,078 g de fosfato de sódio monobásico monoidratado e completar o volume para 800 mL.

Marcadores: V_0 = padrão de Pullulan $1,6 \times 10^6$ e V_t = sacarose. Pesar 5 mg de marcador, transferir para microtubo de polipropileno de 1 mL, dissolvendo-os em 1 mL de *Fase móvel*.

Grupos O-acetil. O teste é realizado somente nos polissacarídeos A e C. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria no visível (5.2.14)*. Para o polissacarídeo A, diluir a amostra para aproximadamente 10 mg de polissacarídeo seco por mililitro e preparar uma solução amostra diluída (1:20). Para o polissacarídeo C, diluir a amostra para aproximadamente 10 mg de polissacarídeo seco por mililitro e preparar uma solução amostra diluída (1:10). Seguir a **Tabela 2** adicionando os seguintes volumes nos respectivos tubos.

Tabela 2 – Preparações das soluções branco, padrões e amostras.

<i>Substâncias</i>	<i>Água destilada (µL)</i>	<i>Solução padrão de trabalho de acetilcolina 600 µg/mL (µL)</i>	<i>Polissacarídeo A: amostra 1:20 (µL)</i>	<i>Polissacarídeo C: amostra 1:10 (µL)</i>
Branco	1000	---	---	---
Amostras	---	---	1000	---
	---	---	---	1000
P1 (30 ppm)	950	50	---	---
P2 (120 ppm)	800	200	---	---
P3 (240 ppm)	600	400	---	---
P4 (480 ppm)	200	800	---	---
P5 (600 ppm)	---	1000	---	---

Solução alcalina de hidroxilamina: misturar em volumes iguais as *Soluções A e B* no momento do uso.

Solução A: pesar 13,9 g de cloridrato de hidroxilamina, dissolver em água, transferir, quantitativamente, para um balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar. Conservar a solução a 4 °C.

Solução B: pesar 140 g de hidróxido de sódio, dissolver em água destilada, transferir, quantitativamente, para um balão volumétrico de 1000 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar.

Solução C: pesar 1,5 g de cloreto de acetilcolina, dissolver em água destilada, transferir, quantitativamente, para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume e homogeneizar.

Ácido clorídrico 1:3: Transferir, para um frasco graduado, 400 mL de água destilada e, lentamente, adicionar 200 mL de ácido clorídrico concentrado.

Solução de cloreto férrico 0,37 M: pesar 50 g de cloreto férrico hexa-hidratado, dissolver com ácido clorídrico 0,1 M, transferir para um balão volumétrico de 500 mL, completar o volume com ácido clorídrico 0,1 M e homogeneizar.

Soluções padrão de trabalho de acetilcolina (600 µg/mL): diluir a *Solução C* na proporção de 1:25 em água destilada.

Procedimento: adicionar 2 mL de *Solução alcalina de hidroxilamina*. Aguardar dois minutos, adicionar 1 mL de *Ácido clorídrico 1:3* e 1 mL de *Solução de cloreto férrico 0,37 M*. Medir as absorvâncias das soluções resultantes em 540 nm e traçar a curva analítica.

Calcular a concentração de *O*-acetil segundo a expressão:

$$O - \text{acetil} = \frac{L_a}{m} \times 200$$

em que,

O-acetil = concentração de grupos *O*-acetil (µmoles/mg);

L_a = leitura da amostra (µmol/mL);

m = massa do polissacarídeo seco (mg).

A concentração por grama de polissacarídeo calculada em relação à base seca deve cumprir com os limites de 2,0 mmol/g (p/p) para o grupo A, 1,5 mmol/g (p/p) para o grupo C e 0,3 mmol/g (p/p) para os grupos Y e W135.

Fósforo. Proceder ao teste no polissacarídeo A, conforme descrito em *Espectrofotometria no visível (5.2.14)*. Diluir a amostra para aproximadamente 10 mg de polissacarídeo seco por mililitro. Preparar uma solução amostra diluída (1:20). Realizar o teste da amostra em triplicata. Adicionar ao tubo de ensaio do branco, 0,1 mL de água destilada e nos tubos de ensaio da amostra, 0,1 mL da amostra diluída (1:20). Adicionar 0,1 mL de *Reativo de mineralização* no branco e nas amostras. Levar os tubos a termobloco a 250 °C durante quatro horas. Deixar esfriar e, em seguida, adicionar a cada tubo 3,9 mL de água destilada. Pipetar para tubos de ensaio os seguintes volumes da *Solução padrão de fósforo 5 µg/mL* e água destilada, para construção da curva analítica, conforme a **Tabela 3**.

Tabela 3 – Preparações das soluções padrões de fósforo para construção da curva analítica.

<i>Concentração de fósforo (µg/tubo)</i>	<i>Volume da solução padrão de fósforo 5 µg/mL (mL)</i>	<i>Volume de água destilada (mL)</i>
0	0	4,0
1,0	0,2	3,8
2,0	0,4	3,6
4,0	0,8	3,2
8,0	1,6	2,4

Adicionar 4 mL do *Reativo de coloração* a cada tubo da curva analítica e amostras. Homogeneizar e incubar o conjunto de tubos em banho-maria a 37 °C por duas horas. Deixar esfriar. Medir as absorvâncias das soluções resultantes em 825 nm. Traçar a curva analítica em microgramas de fósforo por tubo *versus* absorvância.

Reativo de mineralização: para balão volumétrico de 10 mL, transferir 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e adicionar, muito lentamente, na área central do balão ácido perclórico a 70% (p/p), esfriar, completar o volume e homogeneizar. Armazenar a solução a 4 °C.

Reativo de coloração: no momento de utilizar a solução, adicionar em uma proveta 24 mL de água destilada e acrescentar 12 mL de ácido sulfúrico 3 M, 12 mL de solução de molibdato de amônio a 2,5% (p/v) e 12 mL de solução de ácido ascórbico 10%. Homogeneizar e reservar.

Solução padrão de fósforo a 5 µg/mL: essa solução deve ser preparada por diluição a (1:20) da *Solução padrão de fósforo 100 µg/mL*.

Solução padrão de fósforo 100 µg/mL: dissolver 109,7 mg de fosfato de potássio monobásico, previamente dessecado, em 100 mL de água destilada. Transferir para balão volumétrico de 250 mL e completar o volume até o traço de aferição.

Calcular o percentual de fósforo nas amostras, de acordo com a seguinte expressão:

$$\%fósforo = \frac{Tf}{m} \times 200$$

em que,

Tf = teor de fósforo encontrado na curva (µg);

m = massa seca da amostra (mg).

No mínimo 8% (p/p) do polissacarídeo do grupo A, calculado com referência ao peso seco.

Ácido siálico. O teste é realizado para os polissacarídeos C, W e Y. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria no visível (5.2.14)*. Diluir a amostra para aproximadamente 10 mg de polissacarídeo seco por mililitro. Preparar uma solução da amostra diluída (1:100). Transferir para oito tubos de ensaio, respectivamente, 2 mL, 1,5 mL, 1,9 mL, 1,8 mL, 1,6 mL, 1,2 mL, 0,5 mL e 0 mL de água destilada. Considerar o primeiro tubo como branco e acrescentar no segundo tubo 0,5 mL da amostra de polissacarídeo diluída (1:100) e em cada um dos seis tubos restantes adicionar, respectivamente, 0,1 mL, 0,2 mL, 0,4 mL, 0,8 mL, 1,5 mL e 2 mL de *Solução estoque de ácido N-acetil neuramínico (NANA)* na concentração de 80 µg/mL e agitar. Para cada tubo (branco, padrão e amostra) adicionar 2 mL do *Reativo de coloração*. Agitar e colocar o conjunto de tubos em banho-maria a 100 °C durante 15 minutos. Após resfriar os tubos em banho de gelo durante 10 minutos,

adicionar em cada tubo 4 mL de *Fase orgânica* e agitar durante 30 segundos. Medir a absorvância das soluções resultantes em 585 nm, utilizando branco para ajuste do zero. Somente a parte superior (coloração azul) deve ser submetida à leitura. Traçar a curva analítica a partir dos dados obtidos.

Solução de resorcinol 4%: dissolver 2 g de resorcinol em água destilada, transferir para balão volumétrico de 50 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar. Essa solução é conservada a 4 °C por uma semana. Caso apareça uma coloração rósea, a solução deve ser desprezada.

Solução de sulfato de cobre 0,1 M: dissolver 2,497 g de sulfato de cobre em balão volumétrico contendo 2/3 de água destilada e completar o volume até 100 mL com água destilada. A solução deve ser conservada à temperatura ambiente.

Fase orgânica: para balão volumétrico de 100 mL, transferir 15 mL de álcool butílico, completar o volume com acetato de butila e homogeneizar.

Solução estoque de ácido N-acetil neuramínico (NANA): para balão volumétrico de 100 mL transferir 40 mg de ácido N-acetil neuramínico, completar o volume com água destilada e homogeneizar. Distribuir 2 mL desta solução em frascos de pequeno volume e congelar a – 20 °C.

Solução de trabalho a 80 µg/mL: para balão volumétrico de 10 mL transferir 2 mL da *Solução estoque de ácido N-acetil neuramínico (NANA)*, completar o volume com água destilada e homogeneizar.

Reativo de coloração: no momento do uso, transferir para balão volumétrico de 50 mL, 40 mL de ácido clorídrico concentrado, 2,5 mL de *Solução de resorcinol 4%* e 0,25 mL de *Solução de sulfato de cobre 0,1 M*. Completar para 50 mL com água destilada e homogeneizar.

Calcular a porcentagem de ácido siálico segundo a expressão:

$$\% \text{ÁcSi} = \frac{Tc \times 291,80 \times 100}{m \times 0,5 \times 309,28}$$

em que,

%ÁcSi = porcentagem de ácido siálico;

Tc = teor encontrado na curva;

m = massa seca da amostra (mg).

No mínimo 80% (p/p) do polissacarídeo do grupo C, quando se utiliza ácido N-acetil neuramínico para preparar a solução de referência. No mínimo 56% (p/p) dos polissacarídeos grupos Y e W₁₃₅. As soluções de referência utilizadas são ácido N-acetil neuramínico e glicose para o grupo Y, e ácido N-acetil neuramínico e galactose para o grupo W₁₃₅.

Cálcio. Diluir a amostra para aproximadamente 10 mg de polissacarídeo seco por mililitro. Em um erlenmeyer colocar exatamente 1 mL de amostra, 25 mL de água destilada, indicador (cálcon) e 2 mL de *Solução de hidróxido de sódio 10%*. Titular com *Solução de EDTA 0,005 M* até mudança de coloração do indicador. Realizar em paralelo, prova em branco.

Solução de EDTA 0,005 M: dissolver 925 mg de edetato dissódico em água destilada, transferir, quantitativamente, para balão volumétrico de 500 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar.

Solução de hidróxido 10%: pipetar 20 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 50% (p/v), transferir para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar. Calcular a concentração de cálcio pela equação.

$$\% \text{ Cálcio} = \frac{V \times N \times f \times 0,02 \times 100}{\text{massa do polissacarídeo seco (g)}}$$

em que,

V = volume gasto de EDTA (mL);

N = normalidade do EDTA;

f = fator de correção do EDTA;

0,02 = mEq do cálcio.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Utilizar para cada meio de cultivo 10 mL ou o equivalente a 100 doses, o que for menor. Cumpra o teste.

Teste para avaliação de pirogênios (5.5.2.7). Cumpra o teste. Nos casos em que o *Teste de pirogênios em coelhos (5.5.2.7.2)* for permitido, diluir o polissacarídeo para 0,025 µg/mL e injetar 1 mL/kg. Não reutilizar os animais usados no teste.

No preparo da vacina produto a granel podem ser adicionados um adjuvante, um conservante e um estabilizador, antes da diluição final com diluente adequado. Antes do envase, as amostras do produto devem ser submetidas ao teste de Esterilidade. Se cumprir o requisito, o produto é envasado em recipientes adequados, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

O teste de identificação deve ser realizado por um *Método imunoquímico (5.6)* aprovado, utilizando anticorpos específicos para cada grupo de polissacarídeos.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. As vacinas liofilizadas devem apresentar-se na forma de uma pastilha móvel e de cor branca. Após a reconstituição com o diluente, a vacina deve apresentar-se como uma solução incolor.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 3%.

Distribuição por tamanho molecular. Proceder conforme descrito em *Distribuição por tamanho molecular* para os polissacarídeos purificados, por exclusão de tamanho.

Para uma vacina grupos A e C, 65% e 75%, respectivamente, dos grupos A e C são eluídos antes do K_d (coeficiente de distribuição) igual a 0,50.

Para uma vacina tetravalente (grupos A, C, Y e W135), quando se aplica a cromatografia e um método imunoquímico, os K_d para um pico principal devem ser menores ou iguais a 0,70 para os grupos A e C, 0,57 para o grupo Y e 0,68 para o grupo W135.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Teste para avaliação de pirogênios (5.5.2.7). Cumpre o teste. Nos casos em que o *Teste de pirogênios em coelhos (5.5.2.7.2)* for permitido, diluir as vacinas para conter em cada mL 0,025 µg de polissacarídeo para uma vacina monovalente; 0,050 µg de polissacarídeo para uma vacina divalente e 0,10 µg para uma vacina tetravalente. Injetar 1 mL/kg. Não reutilizar os animais usados no teste.

DOSEAMENTO

Concentração dos polissacarídeos sorogrupos A, C e W₁₃₅.

Para a realização do teste deve ser utilizado equipamento de eletroforese capilar contendo estabilizador eletrônico digital microprocessado, detector UV com comprimento de onda de 200 nm, lâmpada de deutério e amostrador automático, acoplado a um sistema computadorizado com *software* de aquisição e processamento dos resultados. Utilizar voltagem de 10,0 KV, corrente na faixa de 40-60 µA, potência 0,5 W e pressão de injeção 50 mbar.

Equilibrar o sistema para realização da análise acondicionando o capilar com hidróxido de sódio *M* durante 20 minutos, com hidróxido de sódio 0,1 *M* por 10 minutos e com água ultrapurificada durante cinco minutos.

Solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M: pesar 100 mL, 2,8 g de fosfato de sódio dibásico em balança analítica, dissolver em aproximadamente 70,0 mL de água ultrapurificada em banho ultrassônico até sua dissolução total e ajustar o pH com solução ácido clorídrico 0,1 *M* até pH 7,0. Transferir a solução para balão volumétrico de 100 mL, adicionar água ultrapurificada até completar o volume e homogeneizar.

Solução tetraborato de sódio 0,2 M: pesar em um frasco de 100 mL, 4,024 g de tetraborato dissódico em balança analítica, dissolver em aproximadamente 70 mL de água ultrapurificada em ultrassom com aquecimento (faixa de temperatura de 40 - 45 °C) por aproximadamente 30 minutos até dissolução total dos cristais. Transferir a solução para balão volumétrico de 100 mL, adicionar água ultrapurificada até completar o volume. Homogeneizar a solução.

Tampão de fosfato-borato: retirar alíquota de 4 mL da *Solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M*, juntar com 1 mL *Solução tetraborato de sódio 0,2 M* e 10 mL de água ultrapurificada. Proporção de 4:1:10. O pH final desta solução é 9,0. A solução tampão deve ser filtrada com filtro de 0,22 µm de tamanho de poro, antes de ser utilizada.

Solução de hidróxido de sódio M: pesar, com exatidão, 4 g de hidróxido de sódio e dissolver em aproximadamente 70 mL de água ultrapurificada. Transferir, quantitativamente, a solução para balão volumétrico de 100 mL, adicionar água ultrapurificada até completar o volume e homogeneizar. A solução deve ser filtrada em filtro de 0,22 µm de tamanho de poro, antes de ser utilizada.

Solução de hidróxido de sódio 0,1 M: diluir 10 vezes a *Solução de hidróxido de sódio M*. A solução deve ser filtrada em filtro de 0,22 µm de tamanho de poro, antes de ser utilizada.

Preparar padrões dos polissacarídeos A, C e W₁₃₅ a serem utilizados na curva de calibração, na concentração de 500 µg/mL. Reconstituir a vacina meningocócica com *Tampão de fosfato-borato* e

filtrá-la em filtro de 0,22 µm de tamanho de poro antes de transferi-la para os frascos de amostragem do equipamento.

As soluções padrão utilizadas como pontos da curva de calibração devem ser preparadas em tubos de ensaio (5 tubos = P1, P2, P3, P4 e P5), adicionando-se, respectivamente, 450 µL, 600 µL, 750 µL, 900 µL e 1050 µL da solução contendo 500 µg/mL de polissacarídeo de cada sorogrupo e, também respectivamente, 1050 µL, 900 µL, 750 µL, 600 µL e 450 µL de *Tampão de fosfato-borato*. (Observação: filtrar em filtro de 0,22 µm de tamanho de poro todos os pontos das curvas antes de transferi-los para os frascos de amostragem do equipamento).

Construir a curva de calibração para cada sorogrupo de polissacarídeo por regressão linear (concentração dos pontos da curva *versus* áreas dos sinais obtidos) para os padrões dos sorogrupos W₁₃₅, C e A.

Calcular a concentração da amostra a partir dos resultados das áreas plotadas em cada curva de padrão de cada polissacarídeo (W₁₃₅, C e A) conforme a equação da reta: $y = ax + b$.

$$\text{Concentração de polissacarídeo (µg/mL)} = \left(\frac{y-b}{a} \right)$$

$$\text{Concentração de polissacarídeo (µg/dose)} = \left(\frac{y-b}{a} \right) \times 2,5$$

em que,

y = área relativa a cada polissacarídeo;

a = coeficiente angular;

b = coeficiente linear;

2,5 = volume de tampão usado para reconstituição do líófilo.

Os seguintes métodos também podem ser utilizados:

Para uma vacina dos grupos A e C, verificar a concentração de fósforo e ácido siálico como já descritos.

Para uma vacina tetravalente, utilizar um método imunoquímico adequado com um padrão de referência para cada um dos grupos A, C, Y e W₁₃₅.

Cada polissacarídeo deve estar contido na vacina na faixa de 70% a 130% do valor estabelecido no rótulo.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA MENINGOCÓCICA C (CONJUGADA)

Vaccinum meningococcale classis C conjugatum

A vacina meningocócica grupo C (conjugada) é uma preparação líquida ou liofilizada de polissacarídeo capsular, obtido a partir de uma cepa adequada de *Neisseria meningitidis* grupo C, covalentemente ligado a uma proteína carreadora.

O polissacarídeo meningocócico grupo C consiste de unidades repetidas de ácidos siálicos, parcialmente *O*-acetilado ou *O*-desacetilado, ligadas com pontes glicosídicas $2\alpha \rightarrow 9$. A proteína carreadora, quando conjugada ao polissacarídeo meningocócico grupo C, é capaz de induzir uma resposta imune dependente de célula-T. A vacina pode conter um adjuvante.

A produção do polissacarídeo meningocócico grupo C é baseada no sistema de lote semente, que é uma quantidade de ampolas contendo *N. meningitidis* grupo C liofilizado, de composição uniforme, obtido a partir de uma cepa liofilizada de procedência conhecida. Os meios de cultura utilizados para preservar a viabilidade da cepa liofilizada não devem ser constituídos de proteínas de origem animal. A pureza da cultura deve ser avaliada pela morfologia das colônias, exame microscópico, inoculação da amostra em meios de cultivo adequados e aglutinação da cultura com antissoros específicos.

A *N. meningitidis* grupo C é cultivada em um meio líquido adequado, que não contém polissacarídeos de alto peso. A cultura pode ser inativada por calor e filtrada antes da precipitação do polissacarídeo. O precipitado é purificado por métodos adequados para a remoção de ácidos nucleicos, proteínas e lipopolissacarídeos; a etapa final de purificação deve consistir de uma precipitação com álcool etílico, podendo também ser incluída uma etapa de *O*-desacetilação. As substâncias voláteis no polissacarídeo purificado, inclusive água, são determinadas por termogravimetria ou outro método adequado. O valor é utilizado para o cálculo dos resultados de outros testes com referência à substância dessecada.

Somente os polissacarídeos meningocócicos grupo C que cumprirem os requisitos a seguir podem ser utilizados na formulação da vacina produto à granel.

Identificação. O polissacarídeo meningocócico grupo C é identificado por um *Método imunoquímico* (5.6) ou outro método adequado, como espectrometria por ressonância magnética nuclear ¹H.

Proteína. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacina meningocócica ACWY (polissacarídica)*. No máximo 1,0% de proteína na substância seca.

Ácido nucleico. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacina meningocócica ACWY (polissacarídica)*. No máximo 1,0% por grama de polissacarídeo, calculado com referência à substância seca.

Distribuição por tamanho molecular. A porcentagem de polissacarídeo eluído antes de um dado valor *K_d* (coeficiente de distribuição) ou dentro de uma faixa de valores *K_d*, é determinada por *Cromatografia a líquido de alta eficiência* (5.2.17.4) de exclusão por tamanho. Um valor aceitável é estabelecido especificamente para o produto e cada lote do polissacarídeo meningocócico grupo C deve estar de acordo com esse limite.

Grupos *O*-acetil. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacina meningocócica ACWY (polissacarídica)*. Um valor aceitável é estabelecido para cada produto e cada lote do polissacarídeo meningocócico grupo C deve estar de acordo com este limite.

Ácido siálico. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacina meningocócica ACWY (polissacarídica)*. No mínimo 0,800 g de ácido siálico por grama de polissacarídeo meningocócico grupo C.

Reagentes residuais. Quando for relevante, devem ser realizados testes para determinar resíduos de reagentes utilizados durante a inativação e a purificação. Um valor aceitável para cada reagente é estabelecido especificamente para o produto e cada lote de polissacarídeo meningocócico grupo C deve estar de acordo com este limite. Caso os métodos para remoção de um reagente residual tenham sido validados, o teste no polissacarídeo meningocócico grupo C pode ser omitido.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo 100 UE/ μ g de polissacarídeo meningocócico grupo C.

PROTEÍNA CARREADORA

A proteína carreadora, quando conjugada ao polissacarídeo meningocócico grupo C, deve ser capaz de induzir uma atividade imunogênica adequada. A anatoxina tetânica ou a proteína diftérica CRM 197 são aprovadas para a conjugação. As proteínas carreadoras são produzidas por meio da cultura dos respectivos micro-organismos, na qual é verificada a pureza bacteriana. O cultivo pode ser inativado e a proteína carreadora é purificada por métodos adequados. A proteína carreadora a ser utilizada no preparo do conjugado deve cumprir com os seguintes requisitos. Os micro-organismos utilizados para a produção da proteína carreadora devem ser cultivados em meios de cultura livres de substâncias que possam causar reações tóxicas ou alergênicas ao ser humano. Caso algum componente de origem animal for utilizado no preparo ou preservação do lote semente, ou no processo produtivo, deve cumprir com as exigências estipuladas pela autoridade regulatória nacional.

Identificação. A proteína carreadora é identificada sorologicamente por um *Método imunoquímico (5.6)* adequado. Os métodos físico-químicos que podem ser utilizados para caracterizar a proteína incluem SDS-PAGE; focalização isoeletrica; CLAE; análise de aminoácidos; sequência de aminoácidos; dicroísmo circular; espectroscopia de fluorescência; mapeamento de peptídeo e espectrometria de massa.

Anatoxina tetânica. A anatoxina tetânica é produzida como descrito na monografia de *Toxoide tetânico adsorvido*. Cumpre com os requisitos para anatoxina tetânica purificada, exceto para o teste de esterilidade, o qual não é requerido. O produto apresenta pureza antigênica de, no mínimo, 1500 Lf/mg de nitrogênio proteico.

Proteína diftérica CRM 197. Contém, no mínimo, 90% de proteína diftérica CRM 197, determinada por um método adequado. Alguns testes devem ser realizados, para validação ou rotineiramente, para demonstrar ausência de toxicidade no produto.

O polissacarídeo meningocócico grupo C é modificado quimicamente, sendo parcialmente despolimerizado antes ou durante o procedimento. O conjugado é obtido pela ligação covalente do oligossacarídeo meningocócico grupo C ativado e a proteína carreadora e deve ser submetido aos seguintes controles.

Concentração de sacarídeo. O teor de sacarídeo é determinado por um teste validado adequado, como o ensaio *Ácido siálico*, conforme descrito na monografia de *Vacina meningocócica ACWY (polissacarídica)*, e *Cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (5.2.17.3)*.

Proteína. O conteúdo de proteína deve ser determinado por um método validado e aprovado pela autoridade regulatória nacional. Um valor aceitável é estabelecido para cada produto e cada lote de conjugado a granel deve estar de acordo com esse limite.

Razão polissacarídeo/proteína. Quociente entre concentração de polissacarídeo e concentração proteica. Para cada conjugado, a relação deve estar de acordo com a faixa aprovada pela autoridade regulatória nacional.

Distribuição por peso molecular. A porcentagem de polissacarídeo eluído antes de um dado valor Kd ou dentro de uma faixa de valores Kd, é determinada por *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)* de exclusão por tamanho. Um valor aceitável é estabelecido especificamente para o produto e cada lote de conjugado a granel de polissacarídeo deve estar de acordo com este limite.

Polissacarídeo livre. A concentração de polissacarídeo livre é determinada após a remoção do conjugado, por cromatografias de troca iônica, exclusão por tamanho ou hidrofóbica, ultrafiltração, *Ensaio imunológico (5.6)* ou outros métodos validados. Um valor aceitável é estabelecido para cada produto e cada lote de conjugado a granel deve estar de acordo com este limite.

Proteína livre. A concentração pode ser determinada diretamente por um método adequado ou por derivação, por meio do cálculo dos resultados de outros testes. O valor deve estar dentro dos limites aprovados para cada produto.

Reagentes residuais. A remoção de reagentes residuais, como cianeto, é confirmada por testes adequados ou por validação do processo.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste. Utilizar para cada meio de cultivo 10 mL ou o equivalente a 100 doses, o que for menor.

No preparo da vacina produto acabado a granel podem ser adicionados um adjuvante, um conservante e um estabilizador, antes da diluição final com diluente adequado. Antes do envase, as amostras do produto devem ser submetidas aos testes de *Esterilidade e Timerosal*.

O produto é envasado em recipientes adequados e, se for o caso, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

O teste de identidade deve ser realizado por um *Método imunológico (5.6)* aprovado, utilizando anticorpos específicos para o polissacarídeo purificado.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra da vacina ou, no caso do componente liofilizado, o pH deve ser determinado após a reconstituição com o diluente adequado. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 3%.

Timerosal. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Alumínio. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 1,25 mg/dose individual humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Polissacarídeo livre. A concentração de polissacarídeo livre é determinada após a remoção do conjugado por cromatografias de troca iônica, exclusão por tamanho ou hidrofóbica, ultrafiltração, *Método imunológico (5.6)* ou outros métodos validados. Um valor aceitável consistente com imunogenicidade adequada, conforme descrito em estudos clínicos, é estabelecido para cada produto e cada lote final deve estar de acordo com este limite.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). Cumpre o teste. No máximo 25 UE por dose humana.

DOSEAMENTO

Concentração de sacarídeo. Determinar a concentração de polissacarídeo por meio do ensaio *Ácido siálico*, conforme descrito na monografia de *Vacina meningocócica ACWY (polissacarídica)*, ou por *Cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (5.2.17.3)*. No mínimo 80% da concentração de polissacarídeo do grupo C declarada no rótulo.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpre o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA POLIOMIELITE 1, 2 E 3 (ATENUADA)

Vaccinum poliomyelitidis perorale typus I, II, III

vacina poliomielite 1, 2 e 3 (atenuada); 09051

A vacina oral contra poliomielite consiste de mistura de poliovírus atenuados tipos 1, 2 e 3. É apresentada como suspensão aquosa homogênea transparente, podendo demonstrar coloração devido à presença de indicador de pH.

A produção da vacina é baseada no sistema de lote-semente e a cepa de cada um dos sorotipos de vírus não pode ter mais de três subcultivos a partir do lote original, não podendo induzir neuropatogenia em macacos suscetíveis aos três tipos de poliovírus. A cepa viral tem que demonstrar imunogenicidade adequada e segurança para o ser humano.

A replicação de cada um dos três poliovírus é realizada em cultura de células suscetíveis e a suspensão viral é identificada e controlada quanto à esterilidade. Após clarificação da suspensão viral por método adequado para remoção de resíduos celulares, algumas substâncias estabilizadoras, que, comprovadamente, não alteram a eficácia do produto, são adicionadas. Antes da formulação, cada suspensão viral purificada é avaliada quanto à identificação, concentração viral, esterilidade, consistência da característica viral e neurovirulência em macacos suscetíveis. Após a mistura, a vacina a granel trivalente é submetida aos controles de concentração viral, esterilidade, teor do estabilizador utilizado e pH.

O produto é envasado em recipientes adequados, rotulado e submetido aos controles requeridos.

Outras informações relativas aos critérios de produção e controles estão indicadas na monografia de *Vacinas para uso humano*.

IDENTIFICAÇÃO

Diluir a amostra, adicionar igual volume de mistura de soros antipoliovírus 1, 2, 3 e incubar a 37 °C durante uma hora. Após a incubação, inocular a mistura em células suscetíveis e incubar à temperatura de 35 °C por sete dias. Como controle, utilizar cultura de células inoculada com a diluição da vacina e outra não inoculada, que apresentam, respectivamente, presença e ausência de efeito citopatogênico (ECP). A ausência de ECP na cultura de células inoculada com a mistura de vacina e soros antipoliovírus identifica os vírus vacinais.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Líquido móvel de coloração rósea a avermelhada.

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

pH (5.2.19). 6,0 a 7,0.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Diluir, em meio de cultura adequado, duas amostras da vacina a ser analisada e uma amostra da vacina de referência. O intervalo entre as diluições é de, no mínimo, $0,5 \log_{10}$, e as amostras são diluídas separadamente. Para a determinação de cada tipo de poliovírus, adicionar volumes iguais de cada diluição da vacina à mistura apropriada de soro antipoliovírus. Assim, para a determinação do poliovírus tipo 1, adicionar as diluições da amostra à mistura de soros antipólio tipos 2 e 3; para o poliovírus tipo 2, adicionar as diluições à mistura de soros antipólio tipos 1 e 3 e para o poliovírus 3, adicionar as diluições da vacina à mistura de soros antipólio tipos 1 e 2. Para a determinação do vírus total, adicionar volumes iguais de cada diluição da vacina ao meio de cultura utilizado na diluição. Incubar por uma a três horas à temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a incubação, inocular cada diluição da vacina em, no mínimo, oito orifícios de microplaca contendo a suspensão de células Hep2C. Incubar as microplacas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por sete dias. Observar a presença ou ausência de ECP nas culturas de células. Calcular o título de cada sorotipo por método estatístico validado.

A potência da vacina é o valor da média geométrica dos frascos analisados, expressa em CCID_{50} (dose 50% infectante em cultura de células) por dose. Para a determinação ser considerada válida é necessário que: (a) o controle de cultura de células apresente monocamada inalterada; (b) a variação de potência entre as duas amostras da vacina seja, no máximo, $0,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}$ para cada sorotipo; (c) a potência da vacina de referência varie, no máximo, $0,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}$ do título médio de cada sorotipo; (d) o ECP seja decrescente em relação às diluições crescentes; (e) as diluições utilizadas no ensaio estejam entre 10% e 90% das culturas de células inoculadas.

A potência é de, no mínimo, 10^6 para o poliovírus tipo 1, 10^5 para o poliovírus tipo 2 e $10^{5,78}$ para o poliovírus tipo 3. O intervalo de confiança de 95% do ensaio não pode diferir de um fator maior do que $10^{0,5}$ do CCID_{50} estimado, para cada tipo de vírus contido na vacina. Caso a amostra não cumpra os requisitos, repetir o teste para o(s) tipo(s) de vírus em que a potência estiver abaixo do valor mínimo especificado. A potência é a média das duas determinações realizadas.

TERMOESTABILIDADE

O teste é realizado em paralelo ao *Doseamento*. Incubar duas amostras da vacina à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e determinar o conteúdo total de vírus (tipo 1 + tipo 2 + tipo 3), utilizando o método descrito em *Doseamento*. A vacina pode perder, no máximo, $0,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}$ em relação ao título do vírus total, determinado na amostra conservada em condições adequadas de temperatura. Caso não cumpra o requisito, repetir o teste. O título final é a média dos dois ensaios realizados.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA POLIOMIELITE 1, 2 E 3 (INATIVADA)**Vaccinum poliomyelitidis inactivatum**

A vacina poliomielite inativada é constituída de mistura de poliovírus tipos 1, 2 e 3 inativados e apresentada como um líquido transparente, podendo **surgir** coloração devido à presença de indicador de pH.

A produção da vacina é baseada no sistema de lote-semente e cada um dos sorotipos presentes pode ter no máximo 10 subcultivos a partir do lote original. A replicação do vírus é realizada em cultura de células suscetíveis e a suspensão viral é identificada e controlada quanto à esterilidade. Após clarificação da suspensão viral por método adequado, para remoção de resíduos celulares, cada suspensão viral é concentrada e purificada. A suspensão de cada tipo de vírus é identificada, avaliada quanto à esterilidade, micoplasmas e concentração de vírus. A inativação de cada suspensão viral é realizada separadamente, por um método apropriado como a adição de agentes químicos em condições adequadas. O agente químico mais utilizado é o formaldeído. Antes da mistura dos três tipos de poliovírus inativados e da adição de conservante e outras substâncias, cada suspensão de vírus é avaliada quanto à efetividade da inativação. Após a mistura dos três poliovírus e antes do envase, são realizados controles de ausência de partículas infectivas em células suscetíveis, esterilidade e concentração de conservante.

A vacina é envasada em recipientes adequados, rotulada e submetida aos controles requeridos.

Outras informações relativas aos critérios de produção e controles estão indicadas na monografia de *Vacinas para uso humano*.

IDENTIFICAÇÃO

Atende aos requisitos descritos em *Doseamento*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proteína. Utilizar o método de Kjeldahl (5.3.3.2) ou outro método adequado e validado. No máximo 10 µg/dose.

Formaldeído residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Albumina bovina. No máximo 50 ng por dose humana, determinado por *Método imunoquímico (5.6)*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3). No máximo 5 UE por dose.

DOSEAMENTO

Utilizar método imunoenzimático de sensibilidade comprovada para avaliação da concentração do antígeno D de cada um dos três sorotipos de poliovírus presentes na vacina. Avaliar vacina de referência em paralelo.

A potência é expressa em unidades de antígeno D por dose para os poliovírus tipos 1, 2 e 3 e seus limites mínimos devem estar de acordo com o histórico do registro do produto, aprovados pela autoridade regulatória nacional.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA RAIVA (INATIVADA)

Vaccinum rabiei inactivatum

vacina raiva (inativada); 09053

A vacina é preparada a partir de vírus rábico fixo, replicado em cultura de células e inativada por um método validado. A vacina pode ser apresentada na forma de pó liofilizado ou suspensão. A vacina liofilizada, após reconstituição com diluente apropriado, tem aspecto de suspensão homogênea transparente ou opalescente, podendo apresentar coloração, devido à presença de indicador de pH.

PRODUÇÃO

A produção da vacina é baseada no sistema de lote-semente de vírus. O método de produção deve ter demonstrado prover consistentemente vacinas que atendam aos requerimentos de imunogenicidade, segurança e estabilidade.

SUBSTRATO PARA PROPAGAÇÃO VIRAL

A replicação do vírus é realizada em uma linhagem de células diploides humanas, ou em linhagens contínuas suscetíveis aprovadas pela autoridade regulatória, ou em culturas de células primárias, como de embriões de pinto derivados de plantéis livres de patógenos específicos (*specific pathogen free* – SPF).

LOTES-SEMENTE

O lote-semente de vírus deve estar devidamente caracterizado e apresentar registro de origem e histórico de passagens. Os lotes-semente de vírus de trabalho devem ser preparados por não mais do que cinco passagens a partir do lote-semente mestre.

Para ser empregado na produção da vacina a granel, os seguintes testes devem ser realizados no lote-semente de vírus:

Identificação. Cada lote-semente de vírus é identificado como vírus da raiva usando anticorpos específicos, preferencialmente monoclonais, ou testes de biologia molecular de alta sensibilidade e ampla capacidade de detecção.

Concentração viral. A concentração viral de cada lote-semente de vírus é determinada pelo método de cultura de célula usando imunofluorescência, para garantir consistência de produção.

Agentes adventícios. Conforme descrito na monografia *Vacinas para uso humano*.

COLHEITA VIRAL INDIVIDUAL

Todo o processamento do banco de células e das culturas de células subsequentes deve ser realizado sob condições assépticas em uma área onde nenhuma outra célula seja manipulada. Soro animal aprovado (mas não humano) pode ser usado no meio, mas o meio final para manter o crescimento celular durante a multiplicação do vírus não pode conter soro animal; o meio pode conter albumina humana. A suspensão do vírus é colhida em uma ou mais ocasiões durante a incubação. As colheitas sucessivas da mesma cultura de células de produção podem ser agrupadas e consideradas como uma única colheita viral individual.

Apenas uma colheita viral individual que cumpra os seguintes requisitos pode ser usada na preparação da suspensão viral inativada.

Identificação. O vírus da raiva deve ser identificado por meio de anticorpos específicos, preferencialmente monoclonais, ou testes de biologia molecular de alta sensibilidade e ampla capacidade de detecção.

Concentração viral. A concentração viral é determinada por um método de cultura celular utilizando imunofluorescência, para assegurar a consistência da produção.

Células de controle. Devem ser testadas de acordo com a monografia *Vacinas para uso humano*.

SUSPENSÃO VIRAL INATIVADA

A colheita viral individual de concentração viral conhecida pode ser submetida à concentração e/ou purificação por métodos apropriados e validados. As colheitas virais são submetidas à inativação viral por método validado em uma etapa do processo fixa e bem definida que pode ser antes, durante ou após a concentração ou purificação. Para assegurar a efetividade da inativação viral, devem ser evitadas condições que possam levar à agregação do vírus nas etapas do processo que precedem a inativação do vírus. Quaisquer agregados presentes na preparação a ser inativada devem ser removidos imediatamente antes do processo de inativação, por exemplo, por um método de centrifugação e/ou filtração adequados. Deve ser demonstrado em estudo de validação de processos que o processo de inativação apresenta eficácia consistente para inativar o vírus rábico de forma que garanta uma atividade imunogênica consistente. Esta validação é realizada demonstrando-se: a) que a cinética de inativação viral é consistente em pelo menos cinco lotes consecutivos e b) o tempo necessário para atingir inativação completa. Na rotina de produção o tempo empregado deve ser pelo menos o dobro do tempo para obter a inativação completa.

Quando a beta-propiolactona for usada, a diluição não deve ser inferior a 1:3500 v/v em nenhum momento. Só podem ser usadas para a produção da vacina a granel suspensões virais inativadas que demonstrem:

Verificação da inativação viral por amplificação viral. Imediatamente após à inativação ou utilizando amostra colhida imediatamente após à inativação e congelada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, inocular um volume de 25 mL da suspensão viral inativada, equivalente a, no mínimo, 25 doses de Vacina raiva (inativada) em cultura de células da mesma linhagem utilizada na produção da vacina ou outra linhagem aprovada. Células usadas para o teste devem apresentar alta sensibilidade comprovada na detecção de vírus rábico residual, como por exemplo, as linhagens Vero, BHK-21 e neuroblastoma murino. A proporção usada é de 3 cm^2 de cultura por mililitro de vacina. Após a adsorção do vírus é adicionado meio de cultura em proporção não superior a 1:3 do volume utilizado de vacina. Uma passagem das células pode ser feita aos 7 dias. As culturas são observadas durante 21 dias e a detecção da presença de vírus rábico é feita por imunofluorescência ou por outro método de sensibilidade equivalente. A suspensão viral inativada é considerada satisfatória se não for detectada a replicação de vírus rábico infeccioso residual.

DNA celular residual. Se uma linhagem de células contínua é utilizada na produção, o teor de DNA celular residual deve ser demonstrado por um método adequado e não pode ser maior do que 10 ng por dose do produto. Caso seja considerado mais apropriado, este teste pode ser realizado na *Vacina a granel*.

VACINA A GRANEL

A vacina a granel pode ser preparada a partir de um ou mais lotes de suspensão viral inativada. Nesta etapa apenas devem ser adicionados adjuvantes, conservantes e outras substâncias, como a albumina

humana. A validação de processo deve demonstrar que quaisquer impurezas residuais do processo produtivo são consistentemente reduzidas a um nível comprovadamente seguro. Os seguintes testes devem ser realizados na vacina a granel:

Teor de glicoproteína. Determinar o teor de glicoproteína por um método imunológico apropriado, por exemplo, imunodifusão radial única, ensaio imunoenzimático ou teste de ligação de anticorpos. O teor deve estar de acordo com os limites aprovados para o produto.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

PRODUTO FINAL

A vacina a granel é envasada assepticamente em recipientes estéreis adequados, podendo ser liofilizado a um teor de umidade que tenha demonstrado ser favorável à estabilidade da vacina. Os frascos são selados para evitar contaminação e entrada de umidade.

Apenas um produto final que atenda aos requerimentos, abaixo descritos, pode ser liberado para uso.

Identificação. A vacina deve demonstrar conter antígeno do vírus rábico por um método imunológico adequado, usando anticorpos específicos, preferencialmente monoclonais, ou testes de biologia molecular de alta sensibilidade e ampla capacidade de detecção.

Teor de glicoproteína. Determinar o teor de glicoproteína por um método imunológico apropriado, por exemplo, imunodifusão radial única (SRD), ensaio imunoenzimático ou teste de ligação de anticorpos. O teor deve estar de acordo com os limites aprovados para o produto.

Soro albumina bovina. Máximo de 50 ng por dose individual de vacina, determinado por um método imunológico adequado. Uma vez que o teste para soro albumina bovina tenha sido realizado com resultados satisfatórios na vacina a granel, poderá ser omitido no produto final.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Pirogênios (5.5.2.7). Cumpre o teste. O teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3) pode ser empregado. No máximo 25 UI por dose individual humana. O teste para pirogênios totais é realizado apenas em casos de evidência da presença de pirogênios não endotoxina. Caso não seja possível o emprego do MAT (5.5.2.7.1), o teste de pirogênios em coelhos (5.5.2.7.2) poderá ser empregado, injetando em cada coelho uma dose humana da vacina diluída (1:10) em solução salina estéril e apirogênica.

Umidade residual. Ensaio aplicado no produto liofilizado. Proceder conforme descrito na monografia de Vacinas para uso humano. No máximo 3%.

Fenol. Ensaio aplicado quando o conservante estiver presente. Proceder conforme descrito na monografia de Vacinas para uso humano. No máximo 0,15% (1500 ppm). É facultada ao fabricante a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Timerosal. Ensaio aplicado quando o conservante estiver presente. Proceder conforme descrito na monografia de Vacinas para uso humano. No máximo 0,015% (150 ppm). É facultado ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Ensaio de determinação da atividade imunogênica. O ensaio de atividade imunogênica da vacina raiva inativada é realizado comparando a proteção de camundongos contra uma dose letal de desafio com vírus rábico fixo da cepa CVS (challenge virus standard), conferida por uma vacina teste frente

à proteção conferida por uma vacina de referência com título padronizado em UI/mL. A Unidade Internacional (UI) é a atividade contida em uma quantidade declarada do padrão de referência internacional. A equivalência em UI do padrão de referência internacional é declarada pela Organização Mundial da Saúde (WHO). O padrão de referência empregado no teste deve ser calibrado em relação ao padrão de referência internacional.

Preparar, no mínimo, três diluições da vacina teste e da vacina de referência em solução salina tamponada fosfatada pH 7,6. Inocular, por via intraperitoneal, 0,5 mL de cada diluição da vacina teste e da vacina de referência em, no mínimo, grupos de 16 camundongos saudáveis da linhagem “Swiss Webster” de 10 g a 15 g, com 3 a 4 semanas de idade. Reservar 15 a 30 camundongos não inoculados como 3 grupos controle de 5 a 10 camundongos. de dose letal de desafio. Realizar imunização de reforço inoculando as mesmas diluições em cada grupo de camundongos, sete dias após a primeira imunização. Sete dias após a segunda imunização, executar o desafio, inoculando em cada camundongo volume de 30 µL, de suspensão que contenha cerca de 50 DL₅₀ de vírus rábico fixo da cepa CVS, por via intracerebral sob anestesia. Preparar duas diluições decimais a partir da suspensão de desafio. Inocular 30 µL dessas diluições e da suspensão de desafio, por via intracerebral sob anestesia, nos três grupos controle de 5 a 10 camundongos não imunizados. Observar os animais por 14 dias, registrando o número de sobreviventes de cada grupo. Os animais mortos antes do quinto dia após a inoculação não devem ser considerados para o cálculo da atividade imunogênica. Calcular as doses efetivas 50% (DE₅₀) da amostra e da vacina de referência, assim como a DL₅₀ do vírus desafio, pelo método de probitos.

Os critérios de aceitação de ensaios válidos são: As doses efetivas 50% (DE₅₀) da vacina teste e da vacina de referência estejam entre a maior e a menor doses aplicadas aos camundongos; A titulação da suspensão de desafio apresente no mínimo 10 DL₅₀; A análise estatística demonstre uma inclinação significativa e que não há desvios de linearidade e paralelismo nas curvas dose-resposta; Os limites de confiança não estejam abaixo de 25% ou acima de 400% da atividade determinada. A vacina deve conter no mínimo 2,5 UI/dose individual humana.

Aplicação de parâmetros alternativos. Anestesia deve ser utilizada imediatamente antes do desafio. Na observação dos animais devem ser utilizados desfechos humanitários em lugar do desfecho fatal para reduzir o sofrimento dos animais. Animais em estágio 3 da evolução da doença (tremores, movimentos de agitação e convulsões), indicam claramente a raiva, e devem ser submetidos à eutanásia.

Sinais clínicos dos cinco estágios do progresso da infecção por raiva em camundongos após desafio intracerebral:

Estágio 1 – lordose, pelos eriçados;

Estágio 2 – movimentos lentos, alteração do estado de alerta, movimentos circulares;

Estágio 3 – tremores, movimentos de agitação, convulsões;

Estágio 4 – paresia e paralisia;

Estágio 5 – prostração, moribundo.

O uso de métodos alternativos validados, em substituição ao método *in vivo*, é recomendado, de acordo com a monografia de Vacinas para uso humano. Os métodos alternativos devem ser métodos imunoenzimáticos e devem empregar anticorpos monoclonais neutralizantes do vírus da raiva, extensivamente caracterizados, e direcionados contra a glicoproteína G de vírus rábico em sua conformação nativa (trimérica). Os métodos alternativos devem demonstrar a concordância com a resposta imune em humanos e, portanto, deve discriminar entre lotes potentes e subpotentes e devem ser aprovados pela autoridade regulatória para uso em um produto específico.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra com o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA ROTAVÍRUS HUMANO (ATENUADA)

Vaccinum rotaviri vivum perorale

A vacina rotavírus (atenuada) é obtida a partir de um ou mais sorotipos de uma cepa viva atenuada do rotavírus humano, cultivada em um substrato celular adequado. É apresentada como suspensão aquosa homogênea transparente ou liofilizada a ser reconstituída imediatamente para resultar em uma suspensão ligeiramente turva. A vacina pode apresentar coloração devido à presença de um indicador de pH.

A produção da vacina é baseada no sistema de lote-semente e um sistema de banco de células, e o método deve demonstrar produção de vacinas com consistência e cumprir com os requisitos para imunogenicidade, segurança e estabilidade. A replicação do vírus é realizada em cultura de células suscetíveis, provenientes de um banco de células primário. O vírus na vacina final não deve ter um número maior de passagens do que aquelas utilizadas para preparar a vacina empregada nos estudos clínicos. A cepa de cada um dos sorotipos do vírus utilizados para o preparo do lote-semente primário deve possuir registros históricos, quanto sua origem e manipulações subseqüentes, assim como cumprir com os controles de identidade, concentração de vírus e agentes adventícios. Culturas intermediárias de vírus ou inóculos de produção são submetidas aos ensaios de identidade, esterilidade, concentração de vírus e agentes adventícios. As suspensões virais monovalentes ou a mistura de várias suspensões obtidas para a produção da vacina é controlada quanto à identidade, esterilidade, agentes adventícios e concentração de vírus. A suspensão viral monovalente é então purificada por um método adequado para a remoção de resíduos celulares e, antes da formulação, deve ser avaliada quanto à concentração viral, esterilidade e ADN celular residual.

O produto acabado a granel é obtido pela mistura de uma ou várias suspensões virais monovalentes purificadas, podendo conter mais do que um sorotipo e substâncias estabilizadoras que não alteram a eficácia do produto. Antes do envase, a vacina a granel é submetida ao teste de esterilidade.

O produto é envasado em recipientes adequados, rotulado e submetido aos controles requeridos.

Outras informações relativas aos critérios de produção e controles estão indicadas na monografia de *Vacinas para uso humano*.

IDENTIFICAÇÃO

A. Utilizar um ensaio imunológico com anticorpos específicos para cada tipo de vírus que compõe a vacina.

B. Atende aos requisitos descritos em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 3%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

A. Por Infectividade em células

O ensaio é baseado na visualização de áreas infectadas de uma monocamada de células MA-104, Vero ou outras células suscetíveis cultivadas em meio de cultura adequado e não deve ocorrer interferência ou potencialização entre os sorotipos presentes na vacina. O doseamento da vacina rotavírus é realizado em pelo menos três frascos de amostra e um frasco da vacina referência em triplicata para validar o ensaio. Caso a vacina possua mais que um sorotipo de rotavírus, calcular o título individualmente por um método que demonstre especificidade. Calcular o título da vacina por um método estatístico adequado e expressar em \log_{10} CCID₅₀ (dose 50% infectante cultura de célula) por dose.

Para a determinação ser considerada válida, é necessário que (a) ao final do ensaio o controle de cultura de células apresente monocamada inalterada; (b) a variação de potência entre os três frascos da vacina seja de, no máximo, $0,5 \log_{10}$ CCID₅₀; (c) o intervalo de confiança ($P = 0,95$) da concentração estimada de vírus da vacina de referência para as três replicatas combinadas seja menor do que $\pm 0,3 \log_{10}$ CCID₅₀; (d) o efeito citopático (ECP) seja decrescente em relação às diluições crescentes; (e) as diluições utilizadas no ensaio estejam entre 10% e 90% das culturas de células inoculadas.

O ensaio deve ser repetido se o intervalo de confiança ($P = 0,95$) da concentração combinada do vírus da vacina for maior do que $\pm 0,3 \log_{10}$ CCID₅₀ (ou valor equivalente expresso na unidade do método utilizado para o ensaio). Os dados gerados a partir de ensaios válidos devem ser combinados por métodos estatísticos adequados para calcular a concentração de vírus da amostra. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da concentração de vírus combinados deve ser menor do que $\pm 0,3 \log_{10}$ CCID₅₀.

O título mínimo de cada sorotipo viral é fornecido pelo produtor à autoridade regulatória nacional, de acordo com a análise dos resultados dos estudos clínicos.

B. Por Ensaio baseado na comparação da capacidade da vacina para produzir ARN viral

Para cada lote utilizar pelo menos três frascos de amostra e um frasco da vacina referência em triplicata. Infectar culturas de células em placas de microtitulação com diluições seriadas da amostra em teste e da vacina de referência. Após incubação para permitir a replicação do vírus, o ARN viral nos poços individuais é liberado a partir das células e quantificado por *Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (5.5.1.10)*, como a reação quantitativa em tempo real da transcriptase reversa da polimerase em cadeia (RT-PCR). Calcular a concentração de vírus individual para cada recipiente de vacina contra a preparação de referência, bem como as concentrações combinadas de vírus correspondentes, utilizando método estatístico adequado. A estimativa combinada da concentração de vírus para os três frascos de vacina não pode ser menor do que o indicado no rótulo.

Para a determinação ser considerada válida, é necessário que (a) o controle negativo deve se mostrar inequivocamente negativo; (b) o controle positivo deve mostrar reação positiva; (c) no controle de células não devem ser observadas alterações nas células não-infectadas; (d) no controle de células contaminadas com ARN viral deve haver detecção positiva; (e) as curvas de dose-resposta devem resultar em uma inclinação significativa e sem desvios significativos de linearidade ou paralelismo.

O ensaio deve ser repetido se o intervalo de confiança ($P = 0,95$) da concentração combinada do vírus da vacina for maior do que $\pm 0,3 \log_{10}$ CCID₅₀ (ou valor equivalente expresso na unidade do método utilizado para o ensaio). Os dados gerados a partir de ensaios válidos devem ser combinados por métodos estatísticos adequados para calcular a concentração de vírus da amostra. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da concentração de vírus combinados deve ser menor do que $\pm 0,3 \log_{10}$ CCID₅₀.

O título mínimo de cada sorotipo viral é fornecido pelo produtor à autoridade regulatória nacional, de acordo com a análise dos resultados dos estudos clínicos.

TERMOESTABILIDADE

O teste é realizado em paralelo à *Doseamento*. Incubar a amostra da vacina a 37 °C, por sete dias, e analisar conforme metodologia descrita para a potência do produto. A vacina pode perder, no máximo, 0,5 log₁₀ CCID₅₀/dose, em relação ao título da vacina conservada em condições adequadas de temperatura. A vacina em teste não pode apresentar título inferior ao especificado para a potência do produto.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA RUBÉOLA (ATENUADA)

Vaccinum rubellae vivum

vacina rubéola (atenuada); 09054

A vacina é constituída de vírus vivos atenuados e apresentada sob a forma liofilizada. Após reconstituição com diluente apropriado, tem aspecto de suspensão homogênea transparente, podendo demonstrar coloração devido à presença de indicador de pH.

A produção da vacina é baseada no sistema de lote-semente e a cepa de vírus utilizada ou cinco lotes consecutivos da vacina, não podem induzir neuropatogenia em macacos suscetíveis ao vírus da rubéola. Além disso, a cepa viral tem que demonstrar imunogenicidade adequada e segurança para o ser humano. A replicação do vírus é realizada em cultura de células suscetíveis e a suspensão viral é identificada e controlada quanto à esterilidade. Após a clarificação da suspensão viral, por método adequado para remover resíduos celulares, algumas substâncias estabilizadoras, que, comprovadamente, não alteram a eficácia, nem a segurança do produto, são adicionadas. Antes do envase e liofilização, o produto é analisado quanto à esterilidade, concentração de vírus e proteínas derivadas do soro animal utilizado no cultivo.

O produto é envasado em recipientes adequados, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos.

Outras informações relativas a critérios de produção e seus controles estão indicadas na monografia de *Vacinas para uso humano*.

IDENTIFICAÇÃO

Reconstituir a vacina com diluente apropriado e adicionar a igual volume de soro contendo anticorpos neutralizantes para o vírus da rubéola. Incubar por 90 minutos à temperatura de 4 °C a 8 °C. Após a incubação, inocular a mistura da vacina com o soro, em cultura de células suscetíveis e manter por 12 dias à temperatura de 32 °C a 33 °C. Como controle, uma cultura de células inoculada com o vírus vacinal e outra não-inoculada, respectivamente, têm que apresentar presença e ausência de efeito citopatogênico (ECP). A ausência de ECP na cultura de célula identifica o vírus vacinal.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 2%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Proceder ao abrigo da luz direta. Diluir em intervalos de, no máximo, 1,0 log₁₀, duas amostras da vacina a ser analisada e uma amostra da vacina de referência, em meio de cultura adequado. Inocular cada diluição em, pelo menos, 10 orifícios de microplaca contendo células RK-13 em suspensão e incubar à temperatura de 32 °C a 33 °C por 12 dias. Observar a presença ou ausência de ECP nas culturas de células. Calcular o título da vacina por método estatístico validado. A potência da vacina é o valor da média geométrica dos frascos analisados, expresso em CCID₅₀ (dose 50% infectante em cultura de célula) por dose. Para que a determinação seja considerada válida, é necessário que: (a) o

controle de cultura de células presente monocamada inalterada; (b) a variação de potência entre as duas amostras da vacina seja, no máximo, $0,5 \log_{10}$ CCID₅₀; (c) a potência da vacina de referência não varie mais que $0,5 \log_{10}$ CCID₅₀ do seu título médio; (d) o ECP seja decrescente, em relação às diluições crescentes; (e) as diluições utilizadas no ensaio estejam entre 10% e 90% das culturas de células inoculadas.

A potência é de, no mínimo, 10^3 CCID₅₀/dose. Caso a amostra não cumpra os requisitos, repetir o teste. A potência é a média das duas determinações realizadas. O método de unidades formadoras de “plaque” (UFP) também pode ser empregado e seu valor de potência para aprovação do produto tem que estar correlacionado com o de CCID₅₀.

TERMOESTABILIDADE

O teste é realizado em paralelo ao *Doseamento*. Incubar amostra à temperatura de 37 °C por sete dias e proceder conforme estabelecido em *Doseamento*. A vacina pode perder, no máximo, $1,0 \log_{10}$ CCID₅₀, em relação ao título determinado na amostra conservada em condições adequadas. Além disso, não pode ter título inferior ao preconizado para aprovação do *Doseamento*. Caso não cumpra o requisito, repetir o teste e o título final é a média dos dois ensaios realizados.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA SARAMPO (ATENUADA)

Vaccinum morbillorum vivum

vacina sarampo (atenuada); 09056

A vacina é constituída de vírus vivos atenuados e apresentada sob a forma liofilizada. Após reconstituição com diluente apropriado, tem aspecto de suspensão homogênea transparente, podendo demonstrar coloração devido à presença de indicador de pH.

A produção da vacina é baseada no sistema de lote-semente e a cepa de vírus utilizada, ou cinco lotes consecutivos da vacina, não podem induzir neuropatogenia em macacos suscetíveis ao vírus do sarampo. Além disso, a cepa viral tem que demonstrar imunogenicidade adequada e segurança para o ser humano. A replicação do vírus é realizada em cultura de células suscetíveis e a suspensão de vírus é identificada e controlada quanto à esterilidade. Após a clarificação da suspensão viral por método adequado para remoção de resíduos celulares, algumas substâncias estabilizadoras, que comprovadamente não alteram a eficácia, nem a segurança do produto, são adicionadas. Antes do envase e liofilização, o produto é analisado quanto à esterilidade, concentração de vírus e de proteínas derivadas do soro animal.

O produto é envasado em recipientes adequados, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos.

Outras informações relativas aos critérios de produção e seus controles estão indicadas na monografia de *Vacinas para uso humano*.

IDENTIFICAÇÃO

Reconstituir a vacina com diluente apropriado e adicionar igual volume de soro contendo anticorpos neutralizantes para o vírus do sarampo. Incubar a 36 °C por uma hora. Após a incubação, inocular a mistura em cultura de células suscetíveis e manter à temperatura de 36 °C por sete dias. Utilizar como controles uma cultura de células inoculada com o vírus vacinal e outra não inoculada que apresentam, ao final do teste, presença e ausência de efeito citopatogênico (ECP), respectivamente. A ausência de ECP na cultura de células identifica o vírus vacinal.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder como descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 3%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Proceder ao abrigo da luz direta. Diluir duas amostras da vacina a ser analisada e uma amostra da vacina de referência em intervalos de, no máximo, 1,0 log₁₀, em meio de cultura adequado. Inocular cada diluição em, pelo menos, 10 orifícios de microplaca contendo células Vero em suspensão. Incubar por sete a nove dias entre 35 °C e 37 °C. As culturas de células são observadas quanto à presença ou ausência de ECP, e o título da vacina é calculado segundo o método estimativo de Spearman & Karber. A potência da vacina é o valor da média geométrica dos frascos analisados, expressa em CCID₅₀ (dose 50% infectante em cultura de célula) por dose.

Para que a determinação seja considerada válida é necessário que: (a) ao final do ensaio o controle de cultura de células apresente monocamada inalterada; (b) a variação de potência entre as duas amostras da vacina seja, no máximo, $0,5 \log_{10}$ CCID₅₀; (c) a potência da vacina de referência varie, no máximo, $0,5 \log_{10}$ CCID₅₀ do seu título médio; (d) o ECP seja decrescente em relação às diluições crescentes; (e) as diluições utilizadas no ensaio estejam entre 10% e 90% das culturas de células inoculadas.

A potência da vacina tem que ser, no mínimo, $10^{3,7}$ CCID₅₀/dose para a cepa Biken Cam 70 e $10^{3,0}$ CCID₅₀/dose para as demais cepas. Caso não cumpra os requisitos, repetir a determinação da potência e o resultado é a média geométrica dos dois ensaios realizados.

O método de unidades formadoras de “plaque” (UFP) pode ser, também, empregado e seu valor de potência para aprovação do produto tem que estar correlacionado com o de CCID₅₀.

TERMOESTABILIDADE

O teste é realizado em paralelo ao *Doseamento*. Incubar uma amostra da vacina entre 35 °C e 37 °C, por sete dias, e analisar conforme método descrito para o *Doseamento* do produto. A vacina pode perder, no máximo, $1,0 \log_{10}$ CCID₅₀ em relação ao título determinado na amostra conservada em condições adequadas de temperatura. Não pode apresentar título inferior ao especificado para a potência do produto.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA SARAMPO, CAXUMBA, RUBÉOLA

Vaccinum parotiditis et rubellae et morbillorum vivum

vacina sarampo, caxumba, rubéola; 09055

A vacina é constituída da mistura dos vírus vivos atenuados da caxumba, da rubéola e do sarampo e apresentada sob a forma liofilizada. Após reconstituição com diluente apropriado, tem aspecto de suspensão homogênea transparente, podendo demonstrar coloração devido à presença de indicador de pH.

Cada componente viral presente na vacina é produzido em separado, conforme descrito nas monografias específicas.

O produto é envasado em recipientes adequados, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

Reconstituir a vacina com diluente apropriado e adicionar igual volume da mistura de soros contendo anticorpos neutralizantes para os vírus da caxumba, da rubéola e do sarampo. Manter por 90 minutos à temperatura de 4 °C a 8 °C, inocular em cultura de células suscetíveis e manter por 10 dias. Como controle do teste, culturas de células inoculadas com: a vacina não-neutralizada com a mistura de soros contendo anticorpos para os três tipos de vírus e outra não-inoculada, devem apresentar presença e ausência de efeito citopatogênico, respectivamente. A ausência de ECP na cultura de células inoculadas com a mistura da vacina mais anticorpos, identifica o produto.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 2%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Proceder ao abrigo da luz direta. Diluir duas amostras da vacina a ser analisada e uma amostra da vacina de referência, em intervalos de, no máximo, 1,0 log₁₀ em meio de cultura adequado. Para titular cada tipo de vírus, adicionar a cada diluição da vacina, igual volume de antissoro específico heterólogo, conforme o esquema seguinte:

<i>Vírus a titular</i>	<i>Soro</i>
Caxumba	antissarampo
Rubéola	anticaxumba
Sarampo	anticaxumba

Manter as misturas por 90 minutos à temperatura de 4 °C a 8 °C, para a devida neutralização. Inocular cada diluição em 10 orifícios da microplaca contendo a suspensão de células suscetíveis. Para titulação do vírus da caxumba e do vírus do sarampo, a inoculação é realizada em células Vero, enquanto que, para a rubéola, em células RK-13. Incubar as microplacas contendo células Vero a 36 °C por 10 dias e as microplacas contendo células RK-13 à temperatura de 32 °C a 33 °C por 12 dias.

Observar as culturas de células quanto à presença ou ausência de ECP e calcular os títulos de cada vírus presente na vacina, segundo um método estatístico validado. A potência de cada vírus é o valor da média geométrica dos frascos analisados, expressa em CCID₅₀ (dose 50% infectante em cultura de célula) por dose. Para a determinação ser considerada válida, é necessário que: (a) ao final do ensaio, o controle de cultura de células apresente monocamada inalterada; (b) a variação de potência entre as duas amostras da vacina seja, no máximo, 0,5 log₁₀ CCID₅₀ para cada tipo de vírus; (c) a variação do título da vacina de referência seja, no máximo, 0,5 log₁₀ CCID₅₀ do seu título médio para cada tipo de vírus; (d) o ECP seja decrescente em relação às diluições crescentes; (e) as diluições utilizadas no ensaio estejam entre 10% e 90% das culturas de células inoculadas.

A potência da vacina é, no mínimo, 10^{3,7} CCID₅₀/dose para o vírus da caxumba e 10³ CCID₅₀/dose para os vírus do sarampo e da rubéola. Caso o produto não cumpra os requisitos de potência, o ensaio é repetido para o(s) tipo(s) de vírus em que não foi obtido o título limite para aprovação. A potência da vacina é a média geométrica dos dois ensaios realizados.

O método de unidades formadoras de “plaque” (UFP) também pode ser empregado, e o valor de potência para aprovação do produto tem que estar correlacionado com o de CCID₅₀.

TERMOESTABILIDADE

O teste é realizado em paralelo ao *Doseamento*. Incubar uma amostra da vacina a 37 °C por sete dias e analisar conforme metodologia descrita para a potência do produto. A vacina pode perder, no máximo, 1,0 log₁₀ CCID₅₀/dose, em relação ao título determinado na amostra conservada em condições adequadas de temperatura, para cada tipo viral. Além disso, não pode ter título inferior ao estabelecido para aprovação do *Doseamento*. Caso não cumpra os requisitos, repetir o teste e o título final é a média dos dois testes realizados.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA SARAMPO, CAXUMBA, RUBÉOLA E VARICELA (ATENUADA)

Vaccinum parotiditis et rubellae et morbillorum et varicellae vivum

A vacina é constituída de mistura dos vírus vivos atenuados da caxumba, rubéola, sarampo e varicela. É apresentada sob a forma liofilizada e, após reconstituição com diluente apropriado, tem aspecto de suspensão homogênea transparente, podendo surgir coloração devido à presença de indicador de pH.

Os componentes são produzidos conforme descrito nas monografias específicas.

As suspensões virais de cada componente são misturadas e o produto a granel é submetido ao controle de esterilidade.

O produto é envasado em recipientes adequados, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

Reconstituir a vacina com diluente apropriado e misturar com anticorpos específicos para os vírus da caxumba, rubéola, sarampo e varicela. Quando a vacina é misturada com quantidades de anticorpos suficientes para neutralizar três componentes, o quarto componente deve apresentar ECP na cultura de células suscetíveis.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. O limite máximo deve garantir que o produto mantenha sua estabilidade, de acordo com o registro submetido à autoridade regulatória nacional.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

DOSEAMENTO

As linhagens celulares e antissoros específicos devem assegurar que a potência de cada vírus seja determinada sem interferência dos outros três componentes. Diluir pelo menos três frascos da vacina a ser analisada e uma amostra da vacina de referência em duplicata, em intervalos de, no máximo, 1,0 log₁₀ em meio de cultura adequado.

Proceder conforme descrito nas monografias de *Vacina sarampo, caxumba, rubéola (atenuada)* e *Vacina varicela (atenuada)*. Para a determinação ser considerada válida, é necessário que: (a) o intervalo de confiança (P = 0,95) da concentração estimada da vacina de referência para a duplicata combinada seja menor do que $\pm 0,3 \log_{10}$ CCID₅₀; (b) a potência da vacina de referência varie no máximo 0,5 log₁₀ CCID₅₀ para os vírus do sarampo, caxumba e rubéola e 0,5 log₁₀ UFP para o vírus da varicela, do seu título estabelecido.; (c) o número de CCID₅₀ seja decrescente em relação às diluições crescentes.

O ensaio deve ser repetido se o intervalo de confiança (P = 0,95) da concentração combinada da concentração viral da vacina for maior do que 0,3 log₁₀ CCID₅₀ (sarampo, caxumba, rubéola) e 0,3 log₁₀ UFP (varicela); os dados obtidos dos ensaios válidos somente podem ser combinados por métodos estatísticos adequados para calcular a concentração viral da amostra. O intervalo de

confiança ($P = 0,95$) da concentração combinada deve ser no máximo $0,3 \log_{10}$ CCID₅₀ (sarampo, caxumba, rubéola) e $0,3 \log_{10}$ UFP (varicela). Outros métodos de ensaio podem ser utilizados, desde que justificados e aprovados pelas autoridades regulatórias nacionais. No entanto, caso a vacina seja dosada pelo método descrito acima, deve cumprir com os requisitos já estabelecidos.

A potência da vacina é, no mínimo, $10^{3,7}$ CCID₅₀/dose para o vírus da caxumba e $10^{3,0}$ CCID₅₀/dose para os vírus do sarampo e da rubéola. A concentração mínima do vírus da varicela deve ser aprovada pelas autoridades regulatórias, de acordo com os estudos de eficácia e segurança descritos no registro da vacina.

TERMOESTABILIDADE

O teste é realizado para os componentes: sarampo; caxumba e rubéola em paralelo ao *Doseamento*. Incubar uma amostra da vacina a 37 °C por sete dias e analisar conforme método descrito para a potência do produto. A vacina pode perder no máximo $1 \log_{10}$ CCID₅₀/dose, em relação ao título determinado na amostra conservada em condições adequadas de temperatura, para cada tipo viral. Além disso, não pode ter título inferior ao estabelecido para aprovação da determinação da potência.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA SARAMPO, RUBÉOLA

Vaccinum rubellae et morbillorum vivum

vacina sarampo, rubéola; 09057

A vacina é constituída de mistura dos vírus vivos atenuados da rubéola e do sarampo e apresentada sob a forma liofilizada. Após reconstituição com diluente apropriado, tem aspecto de suspensão homogênea transparente, podendo demonstrar coloração devido à presença de indicador de pH.

Cada componente viral presente na vacina é produzido em separado, conforme descrito nas monografias específicas. O produto é envasado em recipientes adequados, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

Reconstituir a vacina com diluente apropriado e adicionar igual volume de mistura de soros contendo anticorpos neutralizantes para os vírus da rubéola e do sarampo. Manter por 90 minutos à temperatura de 4 °C a 8 °C. Inocular em cultura de células suscetíveis e manter por 10 dias. Como controle do teste, cultura de células, inoculada com a vacina não neutralizada com a mistura de soros contendo anticorpos, para os dois tipos de vírus, e outra não inoculada, devem apresentar presença e ausência de efeito citopatogênico (ECP), respectivamente. A ausência de ECP na cultura de células inoculadas com a mistura da vacina mais anticorpos identifica o produto.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 3%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Proceder ao abrigo da luz direta. Diluir duas amostras da vacina a ser analisada e uma amostra da vacina de referência, em intervalos de, no máximo, 1,0 log₁₀ em meio de cultura adequado.

Inocular cada diluição em 10 orifícios da microplaca contendo a suspensão de células suscetíveis. Para titulação do vírus do sarampo a inoculação é realizada em células Vero, enquanto que, para a rubéola, em células RK-13. Incubar as microplacas contendo células Vero a 36 °C por 10 dias e as microplacas contendo células RK-13 à temperatura de 32 °C a 33 °C por 12 dias. Observar as culturas de células quanto à presença ou ausência de ECP e calcular os títulos de cada vírus presente na vacina, segundo um método estatístico validado.

A potência de cada vírus é o valor da média geométrica dos frascos analisados, expressa em CCID₅₀ (dose 50% infectante em cultura de célula) por dose. Para a determinação ser considerada válida, é necessário que: (a) ao final do ensaio o controle de cultura de células apresente monocamada inalterada; (b) a variação de potência entre as duas amostras da vacina seja, no máximo, 0,5 log₁₀ CCID₅₀ para cada tipo de vírus; (c) a variação do título da vacina de referência seja, no máximo, 0,5 log₁₀ CCID₅₀ do seu título médio para cada tipo de vírus; (d) o ECP seja decrescente em relação às diluições crescentes; (e) as diluições utilizadas no ensaio estejam entre 10% e 90% das culturas de células inoculadas.

A potência da vacina é, no mínimo, $10^{3,7}$ CCID₅₀/dose para a cepa Biken Cam 70 e 10^3 CCID₅₀/dose para as demais cepas do vírus do sarampo e da rubéola. Caso o produto não cumpra os requisitos de potência, o ensaio é repetido para o(s) tipo(s) de vírus em que não foi obtido o título limite para aprovação. A potência da vacina é a média geométrica dos dois ensaios realizados.

O método de unidades formadoras de “plaque” (UFP) pode, também, ser empregado e o valor de potência para aprovação do produto tem que estar correlacionado com o de CCID₅₀.

TERMOESTABILIDADE

O teste é realizado em paralelo ao *Doseamento*. Incubar uma amostra da vacina à 37 °C por sete dias e analisar conforme metodologia descrita para a potência do produto. A vacina pode perder, no máximo, $1,0 \log_{10}$ CCID₅₀/dose, em relação ao título determinado na amostra conservada em condições adequadas de temperatura, para cada tipo viral. Além disso, não pode ter título inferior ao estabelecido para aprovação do *Doseamento*. Caso não cumpra os requisitos, repetir o teste. O título final é a média dos dois testes realizados.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA VARICELA (ATENUADA)

Vaccinum varicellae vivum

A vacina é constituída de vírus vivos atenuados da varicela e apresentada sob a forma liofilizada. Após reconstituição com diluente apropriado, tem aspecto de suspensão homogênea, transparente, podendo demonstrar coloração devido à presença de indicador de pH.

A produção da vacina é baseada no sistema de lote-semente e a cepa de vírus utilizada na produção da vacina tem que demonstrar imunogenicidade adequada e segurança para o ser humano, e não pode induzir neuropatogenia em macacos suscetíveis ao vírus da varicela.

A replicação do vírus é realizada em cultura de célula diploide humana suscetível e a suspensão viral é submetida aos testes de identificação, esterilidade, concentração viral e agentes adventícios. Após a clarificação da suspensão viral por método adequado para remoção de resíduos celulares, podem ser adicionadas algumas substâncias estabilizadoras que comprovadamente não alteram a eficácia e segurança do produto. O produto clarificado é submetido aos controles de identificação e concentração viral.

Antes do envase e liofilização, o produto é analisado quanto à esterilidade. O produto é então envasado em recipientes adequados, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos.

Outras informações relativas aos critérios de produção e seus controles estão indicadas na monografia de *Vacinas para uso humano*.

IDENTIFICAÇÃO

A vacina, quando neutralizada com soro contendo anticorpo específico para o vírus da varicela, inibe a formação de unidades formadoras de “plaque” (UFP) em células suscetíveis conforme descrito em *Doseamento*.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. O limite máximo deve garantir que o produto mantenha sua estabilidade, de acordo com o registro submetido à autoridade regulatória nacional.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Pelo menos três frascos de vacina liofilizada e um de vacina referência são submetidos ao método de unidades formadoras de “plaque” (UFP). A concentração viral da vacina de referência é estabelecida com base em dados históricos de cada laboratório e deve ser monitorada por gráfico controle. Diluir as amostras da vacina e inocular em placas ou frascos contendo monocamada de cultura de célula diploide humana suscetível.

Calcular a concentração viral individual para cada frasco de vacina e para cada replicata da vacina de referência por métodos estatísticos validados, a qual é expressa em \log_{10} UFP/dose. Para a determinação ser considerada válida é necessário que (a) o intervalo de confiança ($P = 0,95$) da concentração estimada da vacina de referência para as três replicatas combinadas seja menor do que

$\pm 0,3 \log_{10}$ UFP; (b) a potência da vacina de referência varie, no máximo, $0,5 \log_{10}$ UFP do seu título estabelecido.

O ensaio deve ser repetido se o intervalo de confiança ($P = 0,95$) da concentração viral combinada da vacina for maior do que $\pm 0,3 \log_{10}$ UFP; dados obtidos dos ensaios válidos somente podem ser combinados por métodos estatísticos adequados para calcular a concentração viral da amostra. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da concentração viral combinada é, no máximo, $\pm 0,3 \log_{10}$ UFP.

Outros métodos de ensaio podem ser utilizados, desde que justificados e aprovados pelas autoridades regulatórias nacionais. No entanto, caso a vacina seja dosada pelo método descrito acima, deve cumprir com os requisitos já estabelecidos.

A potência mínima deve ser aprovada pelas autoridades regulatórias, de acordo com os estudos de eficácia e segurança descritos no registro da vacina.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINAS PARA USO HUMANO

Vaccina ad usum humanum

As vacinas para uso humano são medicamentos, geralmente, de caráter profilático, capazes de induzir imunidade específica diante de um agente infeccioso. Sua eficácia e segurança devem ser comprovadas por meio de estudos aprovados pela autoridade reguladora nacional.

As vacinas podem ser constituídas por microrganismos inativados, microrganismos atenuados, substâncias por eles produzidas e frações antigênicas extraídas do microrganismo ou obtidas por meio de síntese ou de engenharia genética. Os métodos empregados para preparação de vacinas dependem de cada tipo de produto e devem obedecer às normas de boas práticas de fabricação de produtos farmacêuticos.

VACINAS BACTERIANAS

As vacinas bacterianas são produzidas em meios líquidos ou sólidos, utilizando cepas adequadas de bactérias inativadas, bactérias atenuadas (vivas) ou seus componentes antigênicos. Apresentam-se sob a forma de suspensões incolores ou com diferentes graus de opacidade, ou liofilizadas.

Para a preparação dessas vacinas podem ser utilizadas tanto a totalidade das bactérias cultivadas em meios de cultura adequados, quanto frações antigênicas desses agentes microbianos.

As vacinas inativadas devem ser preparadas por métodos físicos ou químicos, que não destruam sua capacidade antigênica, enquanto vacinas de bactérias vivas são produzidas com cepas atenuadas, capazes de induzir imunidade diante de microrganismo da mesma espécie ou de espécie antigenicamente relacionada. A concentração de bactérias vivas ou inativadas é expressa em termos de Unidades Internacionais de opacidade. Quando apropriado, a concentração pode ser determinada por contagem direta de células ou, para vacinas de bactérias vivas, por meio de contagem de viáveis. O conteúdo de antígenos de vacinas constituídas de frações antigênicas deve ser quantificado por métodos validados.

TOXOIDES BACTERIANOS

Os toxoides bacterianos são toxinas detoxificadas por tratamentos físico-químicos, mantendo sua atividade imunogênica. A produção se baseia no sistema de lote-semente de cepas de microrganismos específicos, cultivados em meios de cultura livres de substâncias que possam causar efeitos tóxicos, alérgicos e outras reações indesejáveis ao ser humano. O método de produção deve impedir que o toxoide possa ser revertido em toxina.

Os toxoides podem ser apresentados sob a forma líquida ou liofilizada e, em ambos os casos, podem ser purificados ou adsorvidos. Os adsorvidos se apresentam sob a forma de suspensão opalescente de coloração branca ou ligeiramente acastanhada e podem formar sedimento no fundo do recipiente de envase.

VACINAS VIRAIS

As vacinas virais consistem em suspensão de vírus atenuados, inativados ou frações deles, podendo apresentar-se sob a forma de pó liofilizado ou suspensão, de vários graus de opacidade. As vacinas inativadas devem ser preparadas por métodos físicos ou químicos, que não destruam sua capacidade antigênica. As vacinas de vírus vivos são produzidas com cepas atenuadas, capazes de induzir imunidade diante de microrganismo da mesma espécie ou de espécie antigenicamente relacionada.

A replicação da cepa viral vacinal é obtida em sistema hospedeiro apropriado (animais, embriões de aves, cultura de células, cultura de tecidos ou cultura de células geneticamente modificadas). As tecnologias de produção estão indicadas nas monografias de cada produto.

VACINAS DE ANTÍGENOS SINTÉTICOS

As vacinas de antígenos sintéticos geralmente são líquidos transparentes ou incolores. O conteúdo de antígenos específicos deve ser quantificado por métodos validados.

VACINAS COMBINADAS

As vacinas combinadas se constituem de uma mistura de dois ou mais antígenos diferentes e podem ser apresentadas sob a forma de pó liofilizado ou de suspensão. Estes imunobiológicos podem possuir, em sua formulação, microrganismos atenuados, microrganismos inativados, substâncias produzidas por eles e frações antigênicas. O processo de produção e controle da qualidade deve obedecer ao mencionado na monografia específica de cada produto presente nesta vacina.

Caso não exista uma monografia que atenda a combinação específica, a vacina deve atender à monografia de cada componente individual, e quaisquer modificações necessárias devem ser submetidas à aprovação pela autoridade reguladora nacional.

PRODUÇÃO

O processo produtivo deve assegurar a capacidade de produzir lotes comparáveis ao lote de vacina de eficácia clínica, imunogenicidade e segurança comprovada. Pormenores da produção, controles em processo e liberação constam nas monografias específicas.

Exceto justificado e autorizado, a produção de vacinas é baseada no sistema de lote-semente, que consiste em estoques de cepas específicas de bactérias, vírus ou células de engenharia biotecnológica usadas para expressar antígenos de vacinas, no intuito de assegurar a consistência da produção. Quando a vacina é produzida em culturas celulares, dois lotes-semente são necessários, um para o substrato celular (banco de células) e outro para o lote-semente de vírus. Um lote-semente mestre é uma preparação fisicamente homogênea, derivada de um clone original e processada de uma só vez, com um número limitado de passagens. O uso de lote-semente limita a replicação da semente e minimiza a possibilidade de variação genética. Todos os lotes-semente devem ser documentados em termos de seu isolamento, derivação (ou construção, no caso de vetor recombinante ou engenharia genética), histórico de passagem e caracterização. As medidas tomadas para assegurar que nenhum agente adventício ou substância indesejável estejam presentes num lote-semente devem ser documentadas. São considerados agentes adventícios os microrganismos que podem ter sido introduzidos involuntariamente no processo de produção, incluindo vírus, fungos, bactérias e micoplasmas. O número de passagens de um vírus, ou o número de subculturas de uma bactéria, a partir do lote-semente mestre, não deve exceder aquele utilizado para a produção de lotes clínicos, sem aprovação da autoridade reguladora nacional.

Em culturas celulares primárias, as células são obtidas por tripsinação de um tecido ou órgão adequado. As células são essencialmente idênticas aos do tecido de origem e devem estar a não mais que 5 passagens *in vitro* da preparação inicial do tecido animal.

O lote-semente mestre é caracterizado por suas propriedades biológicas, bioquímicas e genéticas, pureza e ausência de agentes adventícios. O lote-semente mestre deve ser extensivamente caracterizado para demonstrar a estabilidade do genótipo e do fenótipo para um número de passagens além do nível utilizado na produção. Para produção de rotina, um lote-semente de trabalho pode ser

preparado a partir do lote-semente mestre, dentro de um número limitado de passagens. O lote-semente de trabalho é testado para caracterizar suas propriedades bioquímicas, pureza e ausência de agentes adventícios. O lote-semente de trabalho é validado para o nível de passagem mais alto alcançado durante a produção de rotina.

O controle de agentes adventícios em vacinas virais deve ser baseado em uma análise de risco, devendo englobar os contaminantes advindos do substrato celular, da cepa viral de matérias-primas de origem animal ou vegetal e do processo produtivo. Recomenda-se a utilização de testes *in vitro* e/ou testes de biologia molecular de alta sensibilidade e ampla capacidade de detecção, em detrimento dos testes *in vivo*, visando a redução de uso de animais. Testes *in vivo* apenas devem ser empregados quando o seu uso comprovadamente promove uma mitigação do risco de contaminação por potenciais agentes adventícios virais. Testes de agentes adventícios virais devem ser realizados nos bancos de células/lotes-semente, nos ovos/células controle e na colheita não processada. Outros compêndios oficiais reconhecidos pela legislação vigente da autoridade reguladora, que versa sobre a admissibilidade de outros compêndios e o guia ICH guideline Q5A: *Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin* devem ser considerados no controle de qualidade para assegurar a segurança viral de vacinas para uso humano.

No caso de utilização de cultura de células para replicação de vírus, no mínimo, 5% ou 500 mL da cultura celular, o que for maior em volume, deve ser cultivada nas mesmas condições da cultura celular de produção, sem inoculação viral, como células-controle. Após a cultura por pelo menos 14 dias, ou pelo tempo da cultura de produção (o que for maior), as células não podem apresentar efeito citopático (ECP) quando examinadas microscopicamente. O teste não é válido a menos que pelo menos 80% das culturas celulares permaneçam viáveis até o final do período de observação. Ao menos 25% das células-controle devem ser testadas para hemadsorção com hemácias de cobaia, ou para hemaglutinação, quando cabível. Além disso, aos 14 dias, ou no momento da última colheita viral (o que for maior), alíquotas do meio de crescimento (sobrenadante) das células controle devem ser inoculadas em culturas de linhagens de células permissivas, conforme descrito para a colheita não processada. Se as alíquotas não forem testadas imediatamente após a colheita, devem ser armazenadas a uma temperatura $\leq -40^{\circ}\text{C}$. Após um período de incubação de 14 dias, as culturas celulares são examinadas microscopicamente para detecção de ECP e são testadas para hemadsorção com hemácias de cobaia, ou para hemaglutinação, quando cabível. O teste não é válido a menos que pelo menos 80% das culturas celulares permaneçam viáveis até o final do período de observação. Testes de biologia molecular de alta sensibilidade e ampla capacidade de detecção podem substituir os testes *in vitro*, desde que baseados em evidência científica e devidamente validados.

Caso a cultura de célula utilizada seja de linhagem primária de embrião de aves, as granjas fornecedoras dos ovos devem demonstrar condições adequadas de produção em ambientes isentos de patógenos específicos. Regularmente, as aves são monitoradas quanto a infecções causadas por retrovírus, entre os quais o vírus da leucose aviária, vírus de Newcastle, vírus parainfluenza, vírus da varíola, vírus da encefalomielite, vírus da laringotraqueíte, vírus da reticuloendoteliose, vírus de Marek, adenovírus, vírus influenza, vírus da bronquite infecciosa aviária a vírus da anemia aviária vírus da síndrome da queda de postura ; vírus da varíola aviária , vírus da doença infecciosa da bursa , vírus da nefrite aviária , ortoreovírus aviário , micobactérias (*Mycobacterium avium*), *Haemophilus paragallinarum*, *Salmonella sp*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* dentre outros agentes patogênicos de aves.

Cada lote-semente e colheita de vírus propagado em tecidos de aves e cada colheita de vírus propagada em tecidos primários de aves (inclusive ovos) é testado para detecção de vírus aviários, se a avaliação do risco indicar que este teste proporciona uma mitigação do risco, tendo em conta o painel global de testes. Caso o vírus possa interferir na condução e na sensibilidade do teste, neutralizar o vírus da preparação com um anti-soro específico antes do teste. Neutralizar uma amostra

equivalente a 100 doses humanas de vacina ou 10 mL, o que for maior. Usando 0,5 mL por ovo, inocular um grupo de ovos livres de patógenos específicos (*specific pathogen free* – SPF) fertilizados, com 9 a 11 dias de idade, pela via alantóica e um segundo grupo, com 5 a 7 dias de idade, no saco vitelino. Incubar por 7 dias. Realizar um teste de hemaglutinação nos fluidos alantóides dos ovos contendo embriões vivos. O lote-semente ou a colheita está em conformidade com o teste se os fluidos alantóides não mostrarem sinais da presença de qualquer agente hemaglutinante e se todos os embriões e membranas cório-alantóides examinados para patologia macroscópica forem normais. O teste não é válido a menos que, no mínimo, 80% dos ovos inoculados sobrevivam durante 7 dias.

Quando ovos são utilizados para a produção de vírus, deve-se utilizar 2% ou 20 ovos (o que for maior em número) não inoculados com a cepa vacinal, os quais devem ser incubados nas mesmas condições aplicadas aos ovos inoculados do processo produtivo do vírus. O seguinte teste é realizado nos ovos-controle:

- Inocular 5 mL do líquido amniótico reunido dos ovos de controle em linhagens de células permissivas, adequadas, incluindo células humanas, de macacos e de aves. Observar as culturas celulares durante 14 dias a uma temperatura de incubação adequada. Os ovos controle cumprem o teste se não for encontrada evidência da presença de agentes adventícios demonstrado por ausência de ECP, hemadsorção, ou hemaglutinação com hemácias de galinha, quando cabível. O teste não é válido a menos que, no mínimo, 80% das culturas celulares permaneçam viáveis.

Testes a serem empregados apenas quando o seu uso comprovadamente promover uma mitigação do risco de contaminação de agentes adventícios:

- Teste direto: examinar 0,25 mL do fluido alantóide de cada ovo controle para agentes hemaglutinantes, misturando diretamente com hemácias de galinha;

- Teste após passagem por ovos SPF: inocular 5 mL do líquido amniótico reunido dos ovos de controle em volumes de 0,5 mL na cavidade alantóica ou na cavidade amniótica de ovos SPF de 9 a 11 dias de idade. Após um período de incubação adequado, de no mínimo 5 dias, examinar 0,25 mL do fluido alantóide de cada ovo SPF para agentes hemaglutinantes, misturando com hemácias de galinha.

Os ovos-controle cumprem o teste se não for encontrada evidência da presença de agentes hemaglutinantes em nenhum dos testes. Testes de biologia molecular de alta sensibilidade e ampla capacidade de detecção podem substituir os testes *in vitro*, desde que baseados em evidência científica e devidamente validados.

Vírus da leucose aviária. Quando são utilizados tecidos primários de aves para a produção de vírus, o teste de vírus da leucose aviária é realizado nos lotes-sementes de vírus e no substrato de produção (células-controle ou ovos-controle). Para lotes-sementes, caso o vírus possa interferir na condução e na sensibilidade do teste, neutralizar o vírus na preparação com um anti-soro específico antes do teste. Quando forem utilizadas culturas celulares para produção de vírus, reunir os fluidos sobrenadantes das células-controle aos 14 dias ou no momento da última colheita de vírus, consoante ao que for mais longo. Quando ovos forem utilizados para a produção de vírus, reunir os líquidos amnióticos dos ovos-controle no momento da última colheita do vírus. Realizar a amplificação, por meio da inoculação e, ao menos, 4 passagens em células DF-1 ou culturas de células de embriões de pinto livres de leucose (a partir de tecidos de embriões de 9 a 11 dias de idade de ovos SPF). Usar como inóculo pelo menos 0,5 mL do lote-semente ou pelo menos 5 mL dos fluidos sobrenadantes reunidos das células-controle ou pelo menos 10 mL dos fluidos amnióticos reunidos dos ovos-controle. Realizar 3 ciclos de congelamento/descongelamento para liberar quaisquer antígenos de leucose aviária específicos do grupo. A detecção é realizada no lisado. Paralelamente às amostras, inocular três cepas do vírus da leucose aviária (subgrupos A, B e J) como controles positivos. Vários métodos

podem ser usados para a detecção específica de vírus da leucose aviária (antígeno p27 do ALV), incluindo imunocoloração, ensaio imunoenzimático (ELISA) ou fixação de complemento para leucose aviária (*complement fix avian leucosis* – COFAL). Alternativamente, o ensaio PERT (*product enhanced reverse transcriptase*) pode ser utilizado após amplificação em células DF-1 (linhagem de células aviárias imortalizadas) para detectar retrovírus aviários exógenos (incluindo vírus da leucose aviária). Os lotes-sementes, células-controle ou ovos-controle cumprem o teste se não houver evidência da presença de quaisquer vírus da leucose aviária.

Quando a cultura de célula utilizada for de células diploides humanas ou células de linhagem contínua, elas têm que ser procedentes de um banco de células certificado e demonstrar ausência de agentes adventícios, conforme descrito para células-controle. As medidas tomadas para assegurar que nenhum agente adventício viral ou substância indesejável estejam presentes num banco de células devem ser documentadas. Além disso, no banco de células são realizados os testes de identificação, morfologia celular, cariotipagem e tumorigenicidade. Não podem ser tumorigênicas e são identificadas quanto à espécie de origem. O número de passagens das células diploides humanas não pode ultrapassar a dois terços de seu número máximo de passagem, a menos que seja mencionado outro critério na monografia da vacina específica, e seu cariótipo tem que ser normal. Quando a vacina é produzida em células de linhagem contínua, a(s) colheita(s) de vírus, simples ou agrupadas, (*pool*)”, deve (m) ser purificada(s) por um processo que comprove que no produto final o DNA residual é inferior a 10 ng por dose.

A colheita não processada deve ser testada para agentes adventícios. Caso o vírus da vacina possa interferir na condução e na sensibilidade do teste da colheita não processada, neutralizar o vírus da preparação com um anti-soro específico antes do teste. Se a colheita não processada for tóxica ou causar interferência na detecção de vírus em ensaios de cultura celular, pode-se considerar uma diluição mínima da amostra. Alíquotas equivalentes a 500 doses humanas ou 50 mL da colheita não processada devem ser inoculadas em culturas de linhagens de células permissivas. As linhagens de células permissivas devem ser selecionadas com base em uma análise de risco, considerando os potenciais contaminantes advindos do substrato celular, a cepa viral da vacina e as características do processo produtivo. Essas linhagens de células permissivas devem contemplar, no mínimo, uma linhagem celular diploide humana, uma linhagem de células de macaco e a linhagem de células da produção. Realizar a cultura a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Se a cultura celular de produção for mantida a uma temperatura diferente de $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$, um teste suplementar para agentes adventícios virais deve ser realizado na temperatura de produção usando o mesmo tipo de célula empregada na produção. Monitorar durante um período de 14 dias para observação de ECP, após os quais o meio de cultura deve ser utilizado para inocular novas monocamadas das mesmas linhagens celulares se o ECP não tiver sido observado. Monitorar as células por mais 14 dias. As culturas celulares são examinadas microscopicamente para detecção de ECP e são testadas para hemadsorção com hemácias de cobaia, ou para hemaglutinação, quando cabível. A colheita não processada cumpre o teste se as culturas celulares não apresentarem evidência de ECP após 14 dias de incubação, e nenhuma evidência de ECP e de vírus hemadsorvente/hemaglutinante após 28 dias. O teste não é válido a menos que pelo menos 80% das culturas celulares permaneçam viáveis. Testes de biologia molecular de alta sensibilidade e ampla capacidade de detecção podem substituir os testes *in vitro*, desde que baseados em evidência científica e devidamente validados. Caso sejam detectados vírus adventícios na colheita não processada, essa não deve ser utilizada para a fabricação do produto final, a menos que haja justificativa.

Durante os processos de produção das vacinas, algumas substâncias, como estabilizantes, adjuvantes e conservantes, podem ser adicionadas. Quando o antígeno é adsorvido a um adjuvante mineral, a vacina é referida como adsorvida. Vacinas adsorvidas são suspensões e podem formar sedimentos no fundo do recipiente. Algumas vacinas polissacarídicas são conjugadas a carreadores para otimizar a resposta imune. No produto acabado, concentrações muito baixas de antibióticos são permitidas, com

exceção de estreptomicina e de penicilina e seus derivados, desde que seja tecnicamente justificado. Quando a produção de vacinas emprega matérias-primas de origem humana ou animal, como soro bovino e tripsina, a ausência de agentes adventícios na matéria-prima deve ser comprovada. Se soro de origem animal for utilizado no processo de produção, o produto final não pode ter mais que 50 ng/dose de proteínas derivadas do soro. Além disso, o soro deve ser procedente de rebanhos com certificados de ausência de encefalopatia espongiforme bovina. Se albumina obtida do plasma humano for empregada, deve atender os requerimentos da monografia *Plasma humano para fracionamento*.

Quando um anticorpo monoclonal é usado na preparação de vacina (por exemplo, a Proteína A para cromatografia de afinidade imunológica para purificar antígenos), o anticorpo usado deve ser caracterizado e sua pureza determinada. O produto deve ser testado para anticorpos residuais ou a validação de processo deve demonstrar que a impureza residual do processo produtivo foi consistentemente reduzida a um nível comprovadamente seguro.

Se a vacina for produzida em embriões de aves, não deve conter mais de 1 µg de ovalbumina por dose única humana, a menos que outro critério seja estabelecido na monografia específica da vacina.

O produto acabado é distribuído por meio de envase asséptico para recipientes estéreis e invioláveis, podendo ser liofilizado a um teor de umidade que tenha demonstrado ser favorável à estabilidade da vacina. Os frascos são selados para evitar contaminação e entrada de umidade. Quando justificado tecnicamente, certos ensaios prescritos para o produto final podem ser efetuados na vacina a granel, desde que a validação de processo demonstre a efetividade.

CONTROLE DE QUALIDADE DO PRODUTO FINAL

Testes em animais. Recomenda-se a utilização de testes alternativos aos testes *in vivo* de monografias de vacinas específicas, visando a redução de uso de animais ou a redução do sofrimento. Os testes devem ser efetuados de modo a utilizar o número mínimo de animais e a causar o mínimo de dor, sofrimento, aflição ou danos duradouros. Assim, se um teste descrever que um animal é considerado positivo quando ocorrem sinais clínicos característicos ou morte, logo que seja obtida indicação suficiente de um resultado positivo, o animal em questão deve ser eutanasiado ou receber tratamento adequado para evitar sofrimento desnecessário. Os métodos alternativos devem ser validados em comparação ao método *in vivo*. A concordância de resultados entre os métodos deve ser mantida ao longo do ciclo de vida da vacina. A comparabilidade entre os métodos deve ser mantida ao longo do ciclo de vida da vacina. Se os dados de dois procedimentos analíticos não puderem ser comparados estatisticamente, a conclusão sobre comparabilidade será baseada em evidências de que os resultados do método alternativo e do método *in vivo* aprovam/reprovam mesmas amostras. Para métodos de potência, quando a impossibilidade de realizar a validação comparativa entre os métodos alternativos e o método *in vivo* puder ser justificada, o método alternativo precisa refletir tanto o conteúdo quanto a funcionalidade do epítipo (conformação nativa) relevante para a proteção oferecida pela vacina. O método alternativo deve demonstrar sua capacidade de diferenciar amostras de diferentes concentrações e de discriminar entre amostras submetidas a diferentes tipos de condições de estresse. O teste alternativo deve demonstrar a concordância com a resposta imune em humanos e, portanto, deve discriminar entre lotes potentes e subpotentes. O uso de um método alternativo deve ser aprovado pela autoridade reguladora nacional para uso em um produto específico. Podem ser empregados métodos alternativos, aprovados em outros compêndios oficiais reconhecidos pela legislação vigente da autoridade reguladora, que versa sobre a admissibilidade de outros compêndios.

IDENTIFICAÇÃO

Proceder conforme descrito na monografia específica.

CARACTERÍSTICAS

Proceder conforme descrito na monografia específica.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Proceder conforme descrito na monografia específica.

Alumínio

A. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de absorção no visível (5.2.14)*.

Tampão acetato: dissolver 27,5 g de acetato de amônio em 50 mL de água purificada e adicionar 0,5 mL de ácido clorídrico a 25% (p/v). Completar o volume para 100 mL com água purificada.

Tampão carbonato: dissolver 20 g de carbonato de amônio em 20 mL de solução diluída de amônia (diluir 17,5 mL de hidróxido de amônio a 10% (p/v) com 32,5 mL de água purificada) e completar o volume para 100 mL com água purificada.

Transferir para balão de Kjeldahl, 1 mL da amostra e adicionar 2 mL de ácido nítrico. Digerir a mistura até que a solução fique límpida. Transferir para balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com *Tampão acetato*. Transferir 2 mL desta solução para balão volumétrico de 50 mL e adicionar 2 mL de solução recém-preparada de ácido tioglicólico a 1% (v/v). Deixar em repouso por dois minutos, adicionar 15 mL do reagente de aluminon e aquecer em banho-maria (100 °C) por 15 minutos. Resfriar, adicionar 10 mL de *Tampão carbonato* e completar o volume com água purificada. Preparar branco contendo água no lugar da amostra. As leituras da amostra e dos padrões são realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm, utilizando o branco para ajuste do zero. Calcular a concentração de alumínio (III) na amostra, por interpolação gráfica ou regressão linear. O resultado deve ser expresso em mg de alumínio (III) por dose.

B. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Transferir para balão de Kjeldahl, 2 mL da amostra e adicionar 4 mL de ácido nítrico. Digerir a mistura até que a solução fique límpida. Transferir para balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com água purificada. Em paralelo, preparar branco contendo água purificada no lugar da amostra e curva de calibração de alumínio com as concentrações de 20, 40, 60 e 80 ppm. Adicionar à amostra, às soluções para a curva de calibração e ao branco, determinada quantidade de supressor de ionização, de modo a conter, no final, concentração de 2000 ppm de potássio. Determinar a concentração de alumínio (III) na amostra, em espectrofotômetro de absorção atômica no comprimento de onda de 309,3 nm, *Farmacopeia Brasileira, 6ª edição* PB065-00 abertura da fenda 0,2 nm, corrente da lâmpada para alumínio de 10 mA e chama de óxido nitroso/acetileno.

Fenol. Diluir a amostra de modo que a concentração de fenol esteja entre 5 ppm e 30 ppm. Adicionar 5 mL de tampão borato pH 9,0, 5 mL da solução de 4-aminoantipirina a 0,1% (p/v) e 5 mL de solução aquosa de ferricianeto de potássio a 5% (p/v). Em paralelo, preparar branco e curva de calibração de fenol com concentrações variando de 5 ppm a 30 ppm. Proceder às leituras das absorvâncias da amostra e dos padrões no comprimento de onda de 546 nm, 10 minutos após o término da reação, utilizando o branco para zerar o aparelho. Utilizar a leitura dos padrões para construir a curva de calibração. Determinar a concentração de fenol na amostra por interpolação gráfica ou regressão linear. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Formaldeído residual. Adicionar a 1 mL da amostra, lentamente e com agitação, 3 mL de ácido tricloroacético a 2,5% (v/v). Deixar em repouso por cinco minutos, centrifugar a 2000 g por 10 minutos e transferir o sobrenadante para tubo de ensaio. Em paralelo, preparar curva de calibração de formaldeído com as concentrações de 2,5, 5, 7,5 e 10 mL/mL, sendo o volume de 4 mL/tubo. Preparar branco contendo água purificada no lugar da amostra. Adicionar 4 mL de reagente de Hantzsch a cada um dos seis tubos de ensaio preparados anteriormente, deixar em banho-maria a 58 °C por cinco minutos e resfriar. Realizar, imediatamente, as leituras de absorvâncias da amostra e dos padrões, no comprimento de onda de 412 nm, utilizando o branco para zerar o aparelho. As leituras dos padrões são utilizadas para construção da curva de calibração. A concentração de formaldeído residual na amostra é determinada por interpolação gráfica ou regressão linear.

Nitrogênio proteico (5.3.3.2). Cumpre o teste.

Timerosal

Empregar um dos métodos a seguir.

A. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*. Após rigorosa homogeneização da amostra, transferir 1 mL, em duplicata, para béqueres e adicionar 3 mL de água purificada (diluição 1:4), em seguida tomar 1 mL dessa solução e transferir para um tubo de digestão. Adicionar 1 mL de água purificada e 2 mL de uma mistura de igual volume de ácido sulfúrico R e ácido nítrico R. Levar a mistura à ebulição por 10 minutos. Resfriar. Adicionar 10 mL de água purificada e 2 mL de cloridrato de hidroxilamina a 50% (p/v). Levar novamente à ebulição por um minuto, resfriar e transferir o líquido para funil de separação, filtrando através de algodão. Lavar o tubo com 70 mL de água purificada e transferir da mesma maneira para o funil de separação. Adicionar 10 mL da solução de ditizona (1:7), agitar vigorosamente por um minuto. Deixar em repouso por um minuto, filtrar em algodão e recolher a fase orgânica (clorofórmica) em erlenmeyer. Proceder imediatamente a leitura do filtrado em espectrofotômetro a 490 nm. Preparo dos padrões e curva de calibração: Preparar uma solução estoque de timerosal (1200 µg/mL em timerosal ou 600 µg/mL em mercúrio). A partir desta solução, preparar as soluções padrão em balões volumétricos de 100 mL. Estabelecer a curva de calibração com concentrações de 6 µg Hg/mL a 24 µg Hg/mL. Após o preparo das soluções padrão, proceder como descrito para a amostra. O branco é preparado utilizando-se 2 mL de água purificada no lugar da amostra. Utilizar a leitura dos padrões para fazer uma curva de calibração e determinar a concentração de timerosal na amostra por interpolação gráfica ou regressão linear.

B. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Transferir, quantitativamente, 1 mL da amostra para balão volumétrico de 50 mL, adicionar 0,5 mL de ácido nítrico e completar o volume com água purificada. Preparar branco com água purificada. A partir de solução estoque de 1000 ppm de Hg, preparar um padrão intermediário de 1 ppm de Hg e deste retirar alíquotas diferentes, de acordo com o intervalo de trabalho, transferindo-as para as células de reação, contendo solução de permanganato de potássio. Determinar a absorvância a 253,6 nm por vapor frio, em espectrofotômetro de absorção atômica, utilizando nitrogênio como gás de arraste.

Umidade residual. Transferir para pesa-filtro, previamente dessecado e tarado, 80 mg da amostra. Manter a amostra por três horas em atmosfera de pentóxido de fósforo anidro, sob pressão não superior a 5 mm de mercúrio, à temperatura de 60 °C. O pesa-filtro é resfriado por 20 minutos em dessecador contendo sílica-gel e imediatamente pesado. A etapa de aquecimento e resfriamento é repetida até obtenção de peso constante. O valor da umidade residual é a média do percentual de perda de peso de não menos, que três avaliações da amostra. O método volumétrico para *Determinação de água (5.2.20.1)*, também pode ser utilizado.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Pirogênios (5.5.2.7). Cumpre o teste. Proceder conforme descrito na monografia específica.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito na monografia específica.

TERMOESTABILIDADE

Proceder conforme descrito na monografia específica. O teste pode ser omitido como teste de rotina para um determinado produto, uma vez demonstrado o atendimento ao teste, a consistência de produção e a estabilidade nas condições prescritas.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

A temperatura e o prazo de validade são indicados pelo fabricante da vacina, tendo como base evidências experimentais aprovadas pela autoridade reguladora nacional.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

FARMACOPEIA BRASILEIRA

VIII EDIÇÃO



1926-2026



Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Brasília, 2026