

FARMACOPEIA BRASILEIRA

6ª EDIÇÃO



Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Farmacopeia
Brasileira,
6ª edição

Volume II – Monografias

Produtos Biológicos

Brasília
2019

PRODUTOS BIOLÓGICOS

DALTEPARINA SÓDICA	PB001-00
ENOXAPARINA SÓDICA	PB002-00
HEPARINA CÁLCICA	PB003-00
HEPARINA CÁLCICA SOLUÇÃO INJETÁVEL	PB004-00
HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR	PB005-00
HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR SOLUÇÃO INJETÁVEL	PB006-00
HEPARINA SÓDICA BOVINA	PB007-00
HEPARINA SÓDICA SUÍNA	PB008-00
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-CW) PARA USO HUMANO	PB036-00
SOROS HIPERIMUNES PARA USO HUMANO	PB037-00
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)	PB048-00
VACINA HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)	PB049-00
VACINA HEPATITE B (RECOMBINANTE)	PB050-00
VACINA INFLUENZA (ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE, INATIVADA)	PB051-00
VACINA INFLUENZA (FRAGMENTADA, INATIVADA)	PB052-00
VACINA MENINGOCÓCICA ACWY (POLISSACARÍDICA)	PB053-00
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)	PB057-00
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	PB065-00

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.

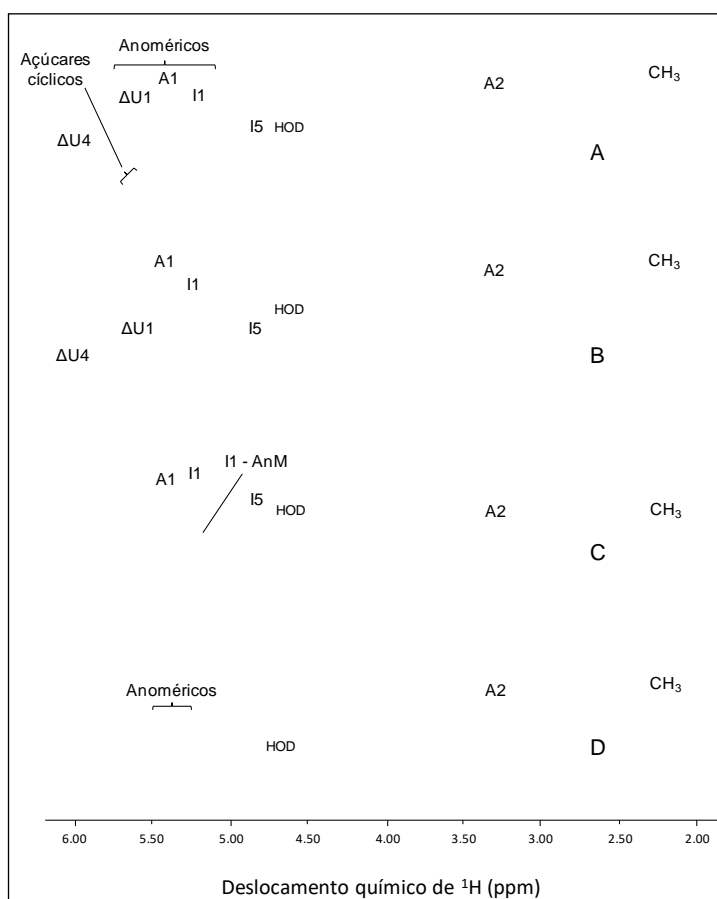


Figura 1 - Espectros de RMN 1D de ^1H de quatro tipos diferentes de heparina de baixo peso molecular.

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 234 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 234 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 UV₂₃₄ ($\sum UV_{234}$) 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:

$$r = \frac{\sum RI}{\sum UV_{234}}$$

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 UV₂₃₄ e RI estão alinhadas e calcular a massa molecular relativa (M) de cada ponto usando a seguinte expressão:

$$M = f \frac{RI}{UV_{234}}$$

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.

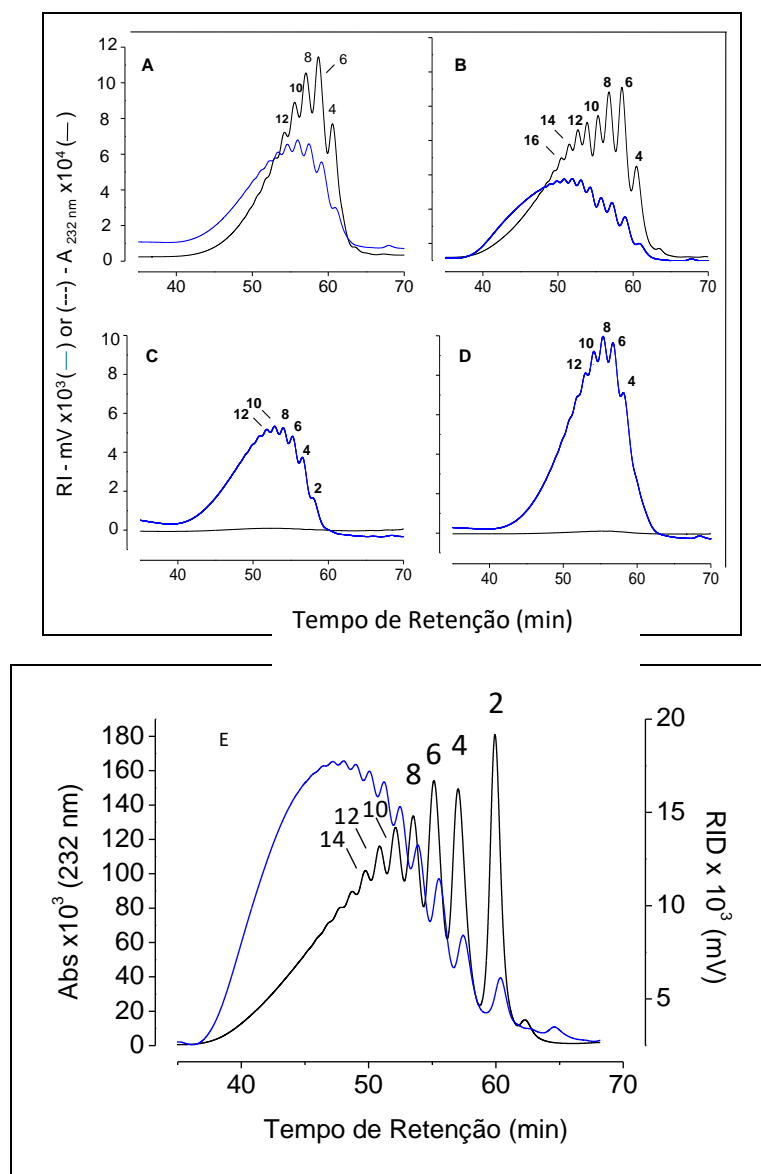


Figura 2 – Perfil de eluição das diferentes heparinas de baixo peso molecular pelo método de cromatografia de gel filtração.

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

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). 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 polietilenoglicol 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 μ L de *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* ou da *Solução amostra*, 25 μ L da *Solução de antitrombina humana* e 10 μ L da *Solução de fator Xa humano*. Após dois minutos de incubação a 37°C, adicionar 25 μ L 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 μ L 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 μ L 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.

Critérios 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*.

Critérios 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.