

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 SÓDICA BOVINA

A heparina sódica bovina é extraída a partir da mucosa intestinal bovina e contém 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 de α -D-glucosamina apresentam padrão mais heterogêneo de sulfatação em comparação com a heparina suína. Em especial observamos 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, respectivamente, 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.

IDENTIFICAÇÃO

A. Cumpre as exigências descritas em *Doseamento*, segundo os métodos I ou II 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 de heparina (SQR) em óxido de deutério 99,9% com 0,02% (p/v) de ácido trimetilsililpropiónico de sódio. Pode ser utilizado um padrão interno de referência de heparina de mucosa intestinal bovina.

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

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, tempo de aquisição mínimo de 2 segundos, tempo de repetição (tempo de espera mais tempo de aquisição) mínimo de 4 segundos. O ensaio deve ser realizado sob a 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*.

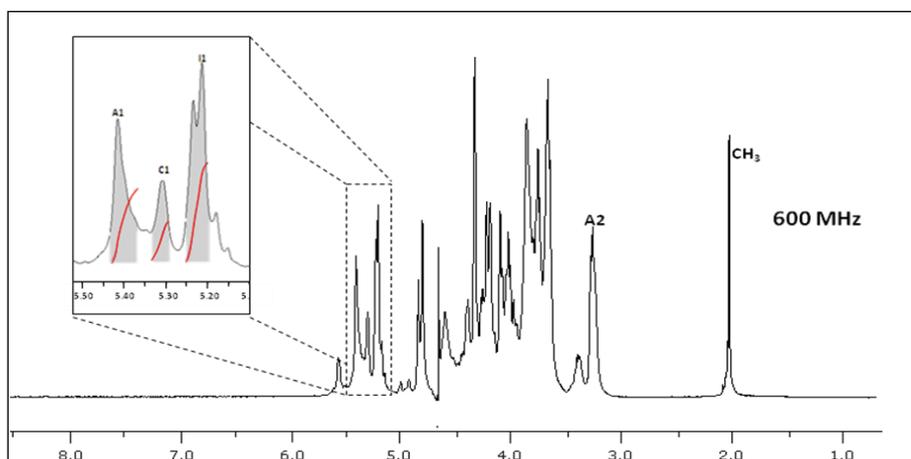
Adequação do sistema: os deslocamentos químicos correspondentes às regiões N-acetil da heparina e do condroitina sulfato supersulfatado na *Solução para a adequação do sistema* devem ser observados entre 2,02 e 2,08 ppm e 2,13 e 2,19 ppm, respectivamente. Os deslocamentos químicos dos sinais correspondentes 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, C1, I1 devem ser obtidos conforme a orientação dos painéis da **Figura 1**. Os espectros de heparina sódica bovina apresentam dois sinais de I1, mas devem ser integrados em conjunto. Espectrômetros de maior resolução mostram a separação de A1 em dois sinais (como exemplificado no painel B da **Figura 1**), mas também devem ser integrados em conjunto. A integral de A1 é tomada como referência. Proceder ao cálculo de acordo com a fórmula:

$$\frac{C1 \times 100}{A1} = 42 - 58$$

Obrigatoriamente, o valor obtido deve estar entre 42 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). Não deve ser observado o deslocamento químico entre 2,13 e 2,19 ppm, correspondentes às regiões *N*-acetil do condroitina sulfato supersulfatado.

A



B

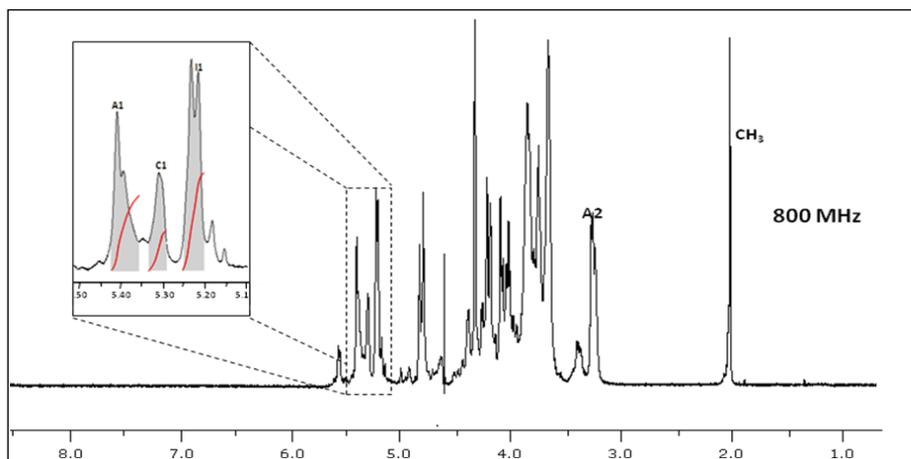


Figura 1 – Heparina sódica bovina analisada em espectrômetro.

Painel A – 600 MHz; Painel B – 800 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 além de $\pm 0,03$ ppm. Pelos “inserts”

percebe-se a expansão das regiões entre 5,10 e 5,50 ppm dos mesmos espectros, para orientar a integração dos sinais A1, C1 e II.

C. Utilizar a técnica de cromatografia líquida de troca iônica para detecção e separação de possíveis contaminantes da heparina sódica bovina como: dermatam sulfato, condroitina sulfato e condroitina sulfato supersulfatado. Utilizar cromatógrafo provido com detector ultravioleta. A leitura pode ser realizada a 202 nm ou 215 nm, desde que atenda à adequação do sistema. Utilizar uma pré-coluna de 50,0 mm de comprimento e 2,0 mm de diâmetro interno empacotada com resina Ionpac AG11 HC (9 µm); coluna de 250 mm de comprimento e 2,0 mm de diâmetro interno, empacotada com Ionpac AS11 HC (9 µm), mantida a 40 °C; fluxo da fase móvel de 0,5 mL/minuto.

Preparar as soluções conforme descrito a seguir.

Eluente A: preparar solução de TRIS a 20 mM. Ajustar pH para 7,4 com ácido clorídrico diluído.

Eluente B: preparar solução de TRIS a 20 mM e NaCl a 2,5 M. Ajustar pH para 7,4 com ácido clorídrico diluído.

Gradiente da fase móvel: adotar sistema de gradiente de 0 a 2,5 M de NaCl, como 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	isocrática
4 – 22	83,4 → 0	16,6 → 100	gradiente linear
22 – 40	0	100	isocrática

Solução de referência de heparina sódica bovina: solubilizar heparina de mucosa intestinal bovina na concentração de 4,0 mg/mL na fase móvel A no momento de realizar o ensaio (**Figura 2C**).

Solução de adequação do sistema: solubilizar sulfato de dermatam SQR e condroitina sulfato supersulfatado SQR na concentração de 0,6 mg/mL e 0,4 mg/mL, respectivamente na *Solução de referência de heparina sódica bovina* na concentração de escolha, no momento de realizar o ensaio (**Figuras 2B e 2C**).

Solução amostra: solubilizar a amostra-teste na concentração de 4,0 mg/mL na fase móvel A.

Procedimento: injetar 50 µL de cada uma das três soluções citadas acima para determinação do perfil de eluição. O pico obtido no cromatograma com a *Solução amostra* deve ser semelhante em forma e tempo de retenção ao pico obtido com a *Solução de referência de heparina bovina* (**Figura 2A**). O tempo de retenção da heparina sódica bovina é cerca de 18 minutos.

Adequação do sistema: a retenção relativa com referência à heparina sódica bovina (tempo de retenção = cerca de 18 minutos) é de 0,9 para o dermatam sulfato e 1,2 para o condroitina sulfato supersulfatado. Na *Solução de adequação do sistema* a relação entre a altura do pico do dermatam sulfato e o vale (linha de base entre os picos de dermatam sulfato e heparina bovina) é de, no mínimo, 1,3. A heparina bovina, em contraste com a suína (ver monografia específica), elui na cromatografia líquida de troca iônica como um pico mais largo e menos resolvido em relação ao dermatam sulfato. Isso demanda atenção especial na análise para atender aos critérios de adequação do sistema.

Critérios de aceitação: não detectar a presença de condroitina sulfato supersulfatado e a quantidade de dermatam sulfato deve ser inferior a 4% dos glicosaminoglicanos totais. Não podem existir outros picos além do pico referente à heparina e ao dermatam sulfato.

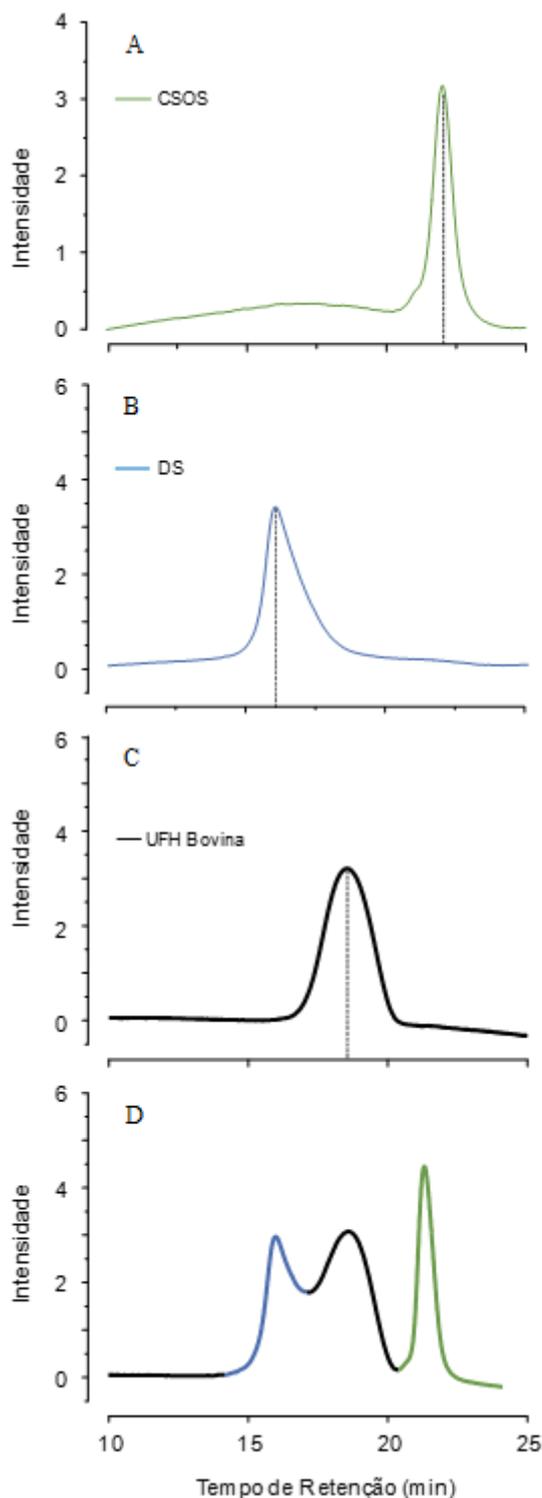


Figura 2 – Perfil de eluição da heparina sódica bovina na cromatografia líquida em coluna de troca iônica

Perfil de eluição do condroitina sulfato supersulfatado, dermatam sulfato e heparina bovina em cromatografia de troca iônica. Foram aplicadas 20 µg de CSOS (A), 30 µg de DS (B), 200 µg de heparina bovina (C) e uma mistura contendo as mesmas quantidades de cada polissacarídeo (D). Os tempos de retenção são iguais para as amostras analisadas separadamente ou misturadas.

CARACTERÍSTICAS

Características físicas. Pó branco ou quase branco, higroscópico.

Solubilidade. Solúvel em água.

ENSAIOS DE PUREZA

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 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1,25% com dois volumes de tartarato de sódio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 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 absorbâncias das soluções a 750 nm, utilizando a solução branco para ajuste do zero.

Curva de calibração: a relação da absorbância 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 absorbâncias 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 absorbância e da curva padrão. No máximo 0,5% em relação à substância dessecada.

Impurezas nucleotídicas. Dissolver 40 mg em 10 mL de água. A absorbância 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)*.

Metais pesados (5.3.2.3). Utilizar o *Método I*. No máximo, 0,003% (30 ppm).

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

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). 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 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 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 heparina (SQR), não importando seu tecido de origem. 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 de atividade anti-IIa.

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 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* 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 da *Solução de substrato cromogênico para fator IIa humano*, 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 absorbância ou mudança de absorbância/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 absorbância 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 -benziloxicarbonil-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 -benziloxicarbonil-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*.

Crêterios 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, 10,20 g de cloreto de sódio, 2,80 g edetato de sódio e, se necessário, 0 a 10,0 g de polietilenoglicol 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 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 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 50-100 μ L 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.

Critérios 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 polietilenoglicol 6000 a 0,1% para se obter concentrações de 0,050 M; 0,075 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: 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 Xa humano: 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 humano: 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 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 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:

$$P = (S_A/S_P)$$

em que

P = potência da heparina sódica bovina em UI/mg de base seca;

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 bovina em UI/mg, de base seca.

Crêterios 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.