

FARMACOPÉIA 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

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

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-hidroxiethylpiperazina-*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 (5.3.3.4)*. 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 µL 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 µm a 10 µm) 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.

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). 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 atravessasse 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.