

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

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.

Concentração de BSA (µg/mL)	Volume de BSA estoque (µL)	Volume de água destilada (µL)
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 absorbâncias 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:

$$\% \text{ÁcNu} = \frac{L_a}{m} \times 50$$

em que

% ÁcNu = % de ácidos nucleicos;

L_a = 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 x 10⁶ 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</i> (µL)	<i>Solução padrão</i> <i>de trabalho de</i> <i>acetilcolina</i> <i>600 µg/mL (µL)</i>	<i>Polissacarídeo A:</i> <i>amostra 1:20</i> (µL)	<i>Polissacarídeo C:</i> <i>amostra 1:10</i> (µL)
Branco	1000	---	---	---
Amostras	---	---	1000	---
P1 (30 ppm)	950	50	---	1000
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:

$$\% \text{fósforo} = \frac{T_f}{m} \times 200$$

em que

T_f = 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. Cumpre o teste.

Pirogênios (5.5.2.1). Diluir o polissacarídeo para 0,025 µg/mL e injetar 1 mL/kg. Não reutilizar os animais usados no teste. Cumpre o 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 Kd (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 imunológico, os Kd 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.

Pirogênios (5.5.2.1). 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. Cumpre o 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 imunológico 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.