



Farmacopeia Brasileira

5^a edição

Primeiro Suplemento

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Farmacopeia Brasileira

5ª edição

Primeiro Suplemento

Brasília
2016

Copyright © 2016 Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)

Diretor-Presidente

Jarbas Barbosa da Silva Júnior

Adjunto do Diretor-Presidente

Pedro Ivo Sebba Ramalho

Diretores

Ivo Bucaresky

Renato Alencar Porto

José Carlos Magalhães da Silva Moutinho

Fernando Mendes Garcia Neto

Adjunto de Diretores

Trajano Augustus Tavares Quinhões

Luciana Shimizu Takara

Roberto César Vasconcelos

Alfredo Souza de Moraes Junior

Chefe de Gabinete

Leonardo Batista Paiva

Superintendência de Medicamentos e Produtos Biológicos

Meiruze Sousa Freitas (superintendente)

Coordenação da Farmacopeia

Varley Dias Sousa

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

DIRETORIA COLEGIADA

RESOLUÇÃO - RDC Nº 59, DE 3 DE FEVEREIRO DE 2016

Aprova o Primeiro Suplemento da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, e dá outras providências.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe conferem os incisos III e IV, do art. 15, da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, inciso V e §§ 1º e 3º do art. 58 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 29, de 21 de julho de 2015, tendo em vista o disposto nos incisos III, do art. 2º, III e IV, do art. 7º da Lei nº 9.782 de 1999, e o programa de Melhoria do Processo de Regulamentação da Agência, instituído por Portaria nº 422, de 16 de abril de 2008, em reunião realizada em 28 de janeiro de 2016, adota a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino sua publicação:

Art. 1º Fica aprovado o Primeiro Suplemento da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição.

Art. 2º Os insumos farmacêuticos, os medicamentos e outros produtos sujeitos à vigilância sanitária devem atender às normas e especificações estabelecidas na Farmacopeia Brasileira.

Parágrafo único. Na ausência de monografia oficial de matéria-prima, formas farmacêuticas, correlatos e métodos gerais na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, e seu suplemento, para o controle de insumos e produtos farmacêuticos poderá ser adotada monografia oficial, em sua última edição, de compêndios internacionais, na forma disposta na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 37, de 6 de julho de 2009.

Art. 3º A Anvisa disponibilizará o suplemento gratuitamente em seu endereço eletrônico.

Art. 4º Ficam internalizadas as Resoluções GMC nº 24/14 “Farmacopeia MERCOSUL: método geral para a determinação de rotação óptica”, GMC nº 25/14 “Farmacopeia MERCOSUL: conceitos de miscibilidade e solubilidade”, GMC nº 26/14 “Farmacopeia MERCOSUL: método geral para a determinação de resíduo por incineração (cinzas sulfatadas)”, GMC nº 12/15 “Farmacopeia MERCOSUL: Faixa ou temperatura de fusão”, GMC nº 13/15 “Farmacopeia MERCOSUL: Perda por dessecação” e GMC nº 15/15 “Farmacopeia MERCOSUL: Determinação de água”.

Art. 5º Os métodos gerais: 5.2.2; 5.2.8; 5.2.9; 5.2.10; 5.2.17.4; 5.2.20 e o conceito de solubilidade apresentado no capítulo 4 - Generalidades da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, passam a vigorar com a redação constante no Primeiro Suplemento da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição.

Art. 6º Esta Resolução entrará em vigor cento e oitenta (180) dias após a sua publicação.

JARBAS BARBOSA DA SILVA JÚNIOR
Diretor-Presidente

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

DIRETORIA COLEGIADA

RESOLUÇÃO - RDC Nº 101, DE 12 DE AGOSTO DE 2016

Dispõe sobre a inclusão da monografia de heparina sódica suína no 1º Suplemento da 5ª edição da Farmacopeia Brasileira.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe conferem o art. 15, III e IV aliado ao art. 7º, III, e IV, da Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, e ao art. 53, V, §§ 1º e 3º do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 61, de 3 de fevereiro de 2016, resolve adotar a seguinte Resolução da Diretoria Colegiada, conforme deliberado em reunião realizada em 14 de junho de 2016, e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação.

Art. 1º Fica aprovada a inclusão da monografia de heparina sódica suína no 1º Suplemento da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição.

Art. 2º Os insumos farmacêuticos, os medicamentos e outros produtos sujeitos à vigilância sanitária devem atender às normas e especificações estabelecidas na Farmacopeia Brasileira.

Parágrafo único. Na ausência de monografia oficial de matéria-prima, formas farmacêuticas, correlatos e métodos gerais na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, e seus suplementos, para o controle de insumos e produtos farmacêuticos poderá ser adotada monografia oficial, em sua última edição, de compêndios internacionais, na forma disposta na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 37, de 6 de julho de 2009.

Art. 3º Fica revogada a monografia da heparina sódica da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição.

Art. 4º Esta Resolução entrará em vigor 180 (cento e oitenta) dias após a sua publicação.

JARBAS BARBOSA DA SILVA JÚNIOR

SUMÁRIO

FARMACOPEIA BRASILEIRA	9
5.2.2 FAIXA OU TEMPERATURA DE FUSÃO	17
5.2.8 DETERMINAÇÃO DE ROTAÇÃO ÓPTICA	19
5.2.9 PERDA POR DESSECAÇÃO	21
5.2.10 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO POR INCINERAÇÃO (CINZAS SULFATADAS)	22
5.2.17.4 CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA	22
5.2.20 DETERMINAÇÃO DE ÁGUA	28
5.5.3.6 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS ALTERNATIVOS	33
1 INTRODUÇÃO	33
2 TIPOS DE TESTES	34
3 PRINCIPAIS MÉTODOS	34
3.1 Métodos baseados no crescimento	34
3.1.1 Aspectos Gerais	34
3.1.2 Métodos Eletroquímicos	34
3.1.3 Bioluminescência	34
3.1.4 Detecção da produção ou consumo de gás	34
3.1.5 Emprego de substratos cromogênicos	34
3.2 Métodos baseados na medida direta da viabilidade	35
3.2.1 Aspectos gerais	35
3.2.2 Citometria de fase sólida	35
3.2.3 Citometria de fluxo	35
3.2.4 Epifluorescência direta	35
3.3 Métodos baseados na análise de componentes celulares	35
3.3.1 Aspectos gerais	35
3.3.2 Fenotípico	36
3.3.2.1 Imunológicos	36
3.3.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	36
3.3.2.4 Espectrometria de massa	36

3.3.2.5 Ensaio bioquímico baseado em reações fisiológicas	37
3.3.3 Genotípico	37
3.3.3.1 Amplificação de ácidos nucleicos	37
3.3.3.2 Impressões digitais	37
4.1 Aspectos gerais	37
4.2 Parâmetros	38
4.2.1 Especificidade	38
4.2.2 Limite de detecção	39
4.2.3 Limite de quantificação	39
4.2.4 Exatidão	39
4.2.5 Precisão	39
4.2.6 Linearidade	39
4.2.7 Intervalo	40
4.2.8 Robustez	40
ACETATO DE CÁLCIO - Calcii acetat	41
ÁCIDO FOSFÓRICO - Acidum phosphoricum	42
ÁGAR-ÁGAR - Agar	43
AZATIOPRINA COMPRIMIDOS	44
BENZOATO DE BENZILA - Benzylis benzoas	45
CEFTAZIDIMA PENTAIDRATADA - Cefazidimum pentahydricum	46
CEFTAZIDIMA PÓ PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL	48
CITALOPRAM COMPRIMIDOS	52
CLOROÍDRÓXIDO DE ALUMÍNIO - Aluminium hydroxydatum chloratum	53
COLA DE FIBRINA - Fibrini glutinum	54
COMPLEXO PROTROMBÍNICO HUMANO TOTAL LIOFILIZADO - Prothrombinum Multiplex Total Humanum Cryodesiccatus	56
DALTEPARINA SÓDICA - Dalteparinum natricum	58
DIFOSFATO DE CLOROQUINA - Cloroquini diphosphas	60
DIGOXINA - Digoxinum	61
DIGOXINA SOLUÇÃO ORAL	62
ENOXAPARINA SÓDICA - Enoxaparinum natricum	63

ERGOCALCIFEROL - Ergocalciferolum	64
ESTEARATO DE ZINCO - Zinci stearas	66
GLICONATO DE ZINCO - Zinci gluconas	67
HEPARINA CÁLCICA SOLUÇÃO INJETÁVEL	69
HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR - Heparinum massae molecularis minoris	70
HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR SOLUÇÃO INJETÁVEL	74
HEPARINA SÓDICA SOLUÇÃO INJETÁVEL	76
HEPARINA SÓDICA SUÍNA	78
INSULINA - Insulinum	85
INSULINA HUMANA	91
INSULINA HUMANA INJETÁVEL	93
INSULINA HUMANA ISOFANA SUSPENSÃO	94
INSULINA HUMANA ISOFANA SUSPENSÃO E INSULINA HUMANA INJETÁVEL	94
INSULINA HUMANA ZINCO SUSPENSÃO	96
INSULINA HUMANA ZINCO SUSPENSÃO ESTENDIDA	97
INSULINA INJETÁVEL	97
INSULINA LISPRO	99
METILCELULOSE - Methylcellulosum	101
NADROPARINA CÁLCICA - Nadroparinum calcicum	102
SALICILATO DE METILA - Methylis salicylas	104
SOLUÇÃO DE ALBUMINA HUMANA - Albumini Humani Solutio	105
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-A PARA USO HUMANO Immunoserum adversus A	108
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-A,B PARA USO HUMANO Immunoserum adversus A,B	109
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-B PARA USO HUMANO Immunoserum adversus B	110
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-RH (ANTI-D, ANTI-C, ANTI-E, ANTI-c, ANTI-e E ANTI-CW) PARA USO HUMANO - Immunoserum adversus Rh	110
SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA SUSPENSÃO ORAL.....	112
SULFATO DE POTÁSSIO - Kalli sulfas	114
SULFATO DE SALBUTAMOL COMPRIMIDOS	115

SULFATO DE SÓDIO DECAIDRATADO - Natrii sulfas	117
TIAMAZOL - Thiamazolum	118
TINZAPARINA SÓDICA - Tinzaparinum natricum	119
TRETINOÍNA - Tretinoinum	120
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS E HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA) - Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis adsorbatum et haemophili stirpe b conjugatum	121
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS, HEPATITE B (RECOMBINANTE) E HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA) - Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis, hepatitidis B adsorbatum et haemophili stirpe b conjugatum	123
VACINA HAEMOPHILUS INFLUENZAE b (CONJUGADA) Vaccinum haemophili stirpe b conjugatum	125
VACINA HEPATITE B (RECOMBINANTE) Vaccinum hepatitidis B ADN recombinatum	130
VACINA MENINGOCÓCICA ACWY (POLISSACARÍDICA) Vaccinum meningococcale polysaccharidicum	131
VACINA MENINGOCÓCICA C (CONJUGADA) - Vaccinum meningococcale classis C conjugatum	138
VARFARINA sódica COMPRIMIDOS	140

FARMACOPEIA BRASILEIRA

PRESIDENTES DAS EDIÇÕES ANTERIORES DA FARMACOPEIA BRASILEIRA

RODOLPHO ALBINO DIAS DA SILVA	1ª edição
LUIZ SALGADO LIMA FILHO	2ª edição
FERNANDO AYRES CUNHA	3ª edição
JOÃO GILVAN ROCHA	4ª edição – Parte I
CELSO FIGUEIREDO BITTENCOURT	4ª edição – Parte II
GERSON ANTÔNIO PIANETTI	5ª edição

CONSELHO DELIBERATIVO DA FARMACOPEIA BRASILEIRA – CDFB

PRESIDENTE

NORBERTO RECH

VICE-PRESIDENTE

GERSON ANTÔNIO PIANETTI

MEMBROS

ADRIANO ANTUNES DE SOUZA ARAÚJO
Universidade Federal de Sergipe – UFS

ANTÔNIO CESAR SILVA MALLETT
Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Anvisa

BRUNO GONÇALVES ARAÚJO RIOS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

CLÉVIA FERREIRA DUARTE GARROTE
Universidade Federal de Goiás – UFG

EDUARDO CHAVES LEAL
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS / FIOCRUZ

ELAINE BORTOLETI DE ARAÚJO
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

ELFRIDES EVA SCHERMAN SCHAPOVAL
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

ÉRICO MARLON DE MORAES FLORES
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

GERSON ANTÔNIO PIANETTI
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

JOSÉ CARLOS TAVARES CARVALHO
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP

JOSÉ LUIS MIRANDA MALDONADO

Conselho Federal de Farmácia – CFF

JOSÉ MIGUEL DO NASCIMENTO JUNIOR
Ministério da Saúde – MS

LAÍS SANTANA DANTAS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

LAURO DOMINGOS MORETTO
Confederação Nacional da Indústria – CNI

LEANDRO MACHADO ROCHA
Universidade Federal Fluminense – UFF

MIRACY MUNIZ DE ALBUQUERQUE
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

MÔNICA DA LUZ CARVALHO SOARES
Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa

NORBERTO RECH
Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa

ONÉSIMO ÁZARA PEREIRA
Confederação Nacional da Indústria – CNI

THIAGO DE MELLO MORAES
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – MCTI

VLADI OLGA CONSIGLIERI
Universidade de São Paulo – USP

**COORDENAÇÃO DA FARMACOPEIA
AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – Anvisa**

VARLEY DIAS SOUSA – Coordenador

Especialistas em Regulação e Vigilância Sanitária
ELIZABETE REGINA VIANA FREITAS
FERNANDA SMIDT LARA RESENDE
RIVIANE MATOS GONÇALVES
SILVÂNIA VAZ DE MELO MATTOS

Técnica em Regulação e Vigilância Sanitária
RAQUEL PEREIRA GUIMARÃES

COMITÊS TÉCNICOS TEMÁTICOS DA COMISSÃO DA FARMACOPEIA BRASILEIRA – CTT

APOIO À POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS
MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

JOSÉ CARLOS TAVARES CARVALHO - Coordenador
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP

ANA CECÍLIA BEZERRA CARVALHO
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

ANA CLAUDIA FERNANDES AMARAL
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

ANA MARIA SOARES PEREIRA Universidade de
Ribeirão Preto - UNAERP

BERTA MARIA HEINZMANN
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

CLARISSA GIESEL HELDWEIN
Ministério da Saúde – MS

ELFRIEDE MARIANNE BACCHI
Universidade de São Paulo – USP

EMIDIO VASCONCELOS LEITÃO DA CUNHA
Universidade Estadual de Campina Grande – UECG

LUIZ ANTÔNIO BATISTA DA COSTA
Centro de Excelência em Saúde Integral do Paraná –
CESIP

NILTON LUZ NETTO JÚNIOR
Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal –
SES/DF

CORRELATOS

TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI PINTO -
Coordenadora
Universidade de São Paulo – USP

ADRIANA BUGNO
Instituto Adolfo Lutz – IAL

ALBA VALÉRIA DOS SANTOS
Hospira

DENISE FERREIRA LEITE
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

DHALIA GUTEMBERG
Câmara Brasileira de Diagnóstico Laboratorial – CBDL

IRENE SATIKO KIKUCHI
Universidade de São Paulo – USP

LEANDRO SILVA MOURA
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MICHELE FEITOZA SILVA
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde -
INCQS / FIOCRUZ

DENOMINAÇÕES COMUNS BRASILEIRAS

CARLOS CÉZAR FLORES VIDOTTI - Coordenador
Faculdades Integradas da União Educacional do Planalto
Central - FACIPLAC

ONÉSIMO ÁZARA PEREIRA
Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica e de
Insumos Farmacêuticos – ABIQUIFI

PATRÍCIA KOTT TOMAZETT
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

REUS COUTINHO FARIAS
Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa -
Interfarma

RICARDO CHIAPPA
Ministério da Saúde – MS

ROBERTO PARISE FILHO
Universidade de São Paulo – USP

ROSANA MIGUEL MESSIAS MASTELLARO
Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos no
Estado de São Paulo – Sindusfarma

SILVÂNIA VAZ DE MELO MATTOS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA E BIOEQUIVALÊNCIA

SÍLVIA STORPIRTIS - Coordenadora
Universidade de São Paulo – USP

CHANG CHIANN

Universidade de São Paulo – USP

GUSTAVO MENDES LIMA SANTOS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa

ISABELA DA COSTA CESAR

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

JACQUELINE DE SOUZA

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

LEONARDO DE SOUZA TEIXEIRA

Instituto de Ciências Farmacêuticas – ICF

SOLANGE MARIA COUTINHO BRANDÃO

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- INCQS / FIOCRUZ

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS

ELFRIDES EVA SCHERMAN SCHAPOVAL -
Coordenadora

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

ANIL KUMAR SINGH

Universidade de São Paulo – USP

CLÉSIO SOLDATELI PAIM

Universidade Federal do Pampa – Unipampa

HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

Universidade Estadual Paulista – UNESP

JAIR CALIXTO

Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos no
Estado de São Paulo – Sindusfarma

MARCOS VINICIUS SENDA

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MAXIMILIANO SILVA SANGOI

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

NADIA MARIA VOLPATO

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

EXCIPIENTES E ADJUVANTES

PEDRO JOSÉ ROLIM NETO - Coordenador

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

ÁDLEY ANTONINI NEVES DE LIMA

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

CARLOS ROBERTO DOS SANTOS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

ÉRICO MARLON DE MORAES FLORES

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

FABIANA CREMASCHI PALMA

Associação Brasileira dos Distribuidores e Importadores
de Insumos Farmacêuticos – ABRIFAR

GABRIELA GONÇALVES DA SILVA

Ministério da Defesa

ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA

Universidade Federal do Pará – UFPA

FARMACOGNOSIA

AMÉLIA TERESINHA HENRIQUES - Coordenadora

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

ANNY MARGALI TRENTINI

Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico
– ABIFISA

ALBERTO CAVALHEIRO

Universidade Estadual Paulista – UNESP

CAMILA MIRANDA MOURA

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

CID AIMBIRÉ DE MORAES SANTOS

Universidade Federal do Paraná – UFPR

LILIAN AULER MENTZ

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

LUIZ ALBERTO LIRA SOARES

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

TATIANE PEREIRA DE SOUZA

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

GASES MEDICINAIS

CRISTIANE RODRIGUES AUGUSTO – Coordenadora
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e
Tecnologia – INMETRO

DÉSIRÉE MICHELS CORTEZ
Air Liquide Brasil

JOÃO PAULO SILVÉRIO PERFEITO
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

JULIANA ZAMPIERI GIANNINI
Air Products

EDUARDO LUIS TESTA DAS NEVES
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

SÁLVIO FILGUEIRAS
Universidade Anhanguera

HEMOCOMPONENTES E HEMODERIVADOS

JÚLIO CÉSAR CARESTIATO - Coordenador
Universidade Federal Fluminense - UFF

BETTINA MONIKA RUPPELT
Universidade Federal do Paraná – UFPR

ELIZABETH ANGÉLICA LEME MARTINS
Instituto Butantan

JOÃO BATISTA DA SILVA JÚNIOR
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

LYDIA MARCIA DE MELO FRANÇA
Ministério da Saúde

MARISA COELHO ADATI
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde -
INCQS / FIOCRUZ

NEEMIAS SILVA DE ANDRADE
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

SEVERINO BORBA DE ANDRADE
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
– HEMOPE

HOMEOPATIA

LEANDRO MACHADO ROCHA – Coordenador
Universidade Federal Fluminense – UFF

BIANCA OLIVEIRA LOUCHARD
Universidade Federal do Ceará – UFC

CARLA HOLANDINO QUARESMA
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

EZEQUIEL PAULO VIRIATO
Farmácia e Laboratório Homeopático Almeida Prado
Ltda

FRANCISCO JOSÉ DE FREITAS
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro –
UNIRIO

KÉLIA XAVIER RESENDE VASCONCELOS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MARCELO CAMILO MORERA
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

RINALDO FERREIRA
Associação dos Farmacêuticos Proprietários de
Farmácias do Brasil – AFPPB

INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS

MIRACY MUNIZ DE ALBUQUERQUE -
Coordenadora
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

ADRIANO ANTUNES DE SOUZA DE ARAÚJO
Universidade Federal de Sergipe – UFS

LÚCIA DE FÁTIMA FRANCELINO DA SILVA
Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco –
LACEN/PE

TATJANA BOTOVCHENCO SOBESTIANSKY
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

RICARDO NEVES MARRETO
Universidade Federal de Goiás – UFG

SAID GONÇALVES DA CRUZ FONSECA
Universidade Federal do Ceará – UFC

GISELE DE LOURDES NIEVA
Libbs Farmacêutica Ltda

TÉRCIO PASCHKE OPPE
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

MICROBIOLOGIA

CLÉVIA FERREIRA DUARTE GARROTE -
Coordenadora
Universidade Federal de Goiás – UFG

ALINE SIQUEIRA FERREIRA
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA

ANA CRISTINA REGIS DE BARROS CORREIA
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

CLÁUDIO KIYOSHI HIRAI
Biolab Sanus Farmacêutica Ltda

IEDA MARIA SAPATEIRO TORRES
Universidade Federal de Goiás – UFG

MARTIN STEPPE
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

ROSEMARIE APARECIDA DE ARAÚJO BONATTO
Merck

SILÉZIA DE SOUZA AMORIM
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

NORMATIZAÇÃO DE TEXTOS E IDENTIDADE VISUAL

ANTÔNIO BASÍLIO PEREIRA – Coordenador
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

FERNANDO HENRIQUE ANDRADE NOGUEIRA
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

GERSON ANTÔNIO PIANETTI
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

GISELE RODRIGUES DA SILVA
Universidade Federal de São João del-Rei – UFSJ

LAÍS SANTANA DANTAS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

PAULA CRISTINA REZENDE ENÉAS
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

PRODUTOS BIOLÓGICOS E DE BIOTECNOLOGIA

EDUARDO CHAVES LEAL - Coordenador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde -
INCQS / FIOCRUZ

BERNARDO LUIZ MORAES MOREIRA
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

HISAKO GONDO HIGASHI
Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR

LILIA RIBEIRO SERÓDIO
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

MARCO ANTONIO STEPHANO
Universidade de São Paulo – USP

ORLANDO SILVA
Merck

PAULO ANTÔNIO DE SOUZA MOURÃO
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

POLYANA DE ARAÚJO ASSIS
Ministério da Saúde

PRODUTOS MAGISTRAIS E OFICINAIS

VLADI OLGA CONSIGLIERI - Coordenadora
Universidade de São Paulo – USP

ELISABETE PEREIRA DOS SANTOS
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

GUILHERME DINIZ TAVARES
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF

JOSÉ ANTONIO DE OLIVEIRA BATISTUZZO
Faculdades Oswaldo Cruz

IVAN DA GAMA TEIXEIRA
Associação Nacional de Farmacêuticos Magistrais –
ANFARMAG

PATRICIA HAUSCHILDT DE OLIVEIRA MENDES
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

ROBERTO PONTAROLO
Universidade Federal do Paraná – UFPR

RADIOFÁRMACOS

ELAINE BORTOLETI DE ARAÚJO - Coordenadora
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

ANA MARIA SILVEIRA BRAGHIROLI
Instituto de Engenharia Nuclear - IEN-CNEN

CRISTINA MARIA MORIGUCHI JECKEL
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
- PUCRS

JULIANA DE CASTRO ZORATTO
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MARYCEL ROSA FELISA FIGOLS DE BARBOSA
Hospital Albert Einstein

NEUZA TAEKO OKASAKI FUKUMORI
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

SIMONE ODÍLIA
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

SORAYA MARIA ZANDIM MACIEL DIAS
FERREIRA
Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear –
CDTN

SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA

PEDRO EDUARDO FRÖEHLICH - Coordenador
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

ELIZABETE REGINA VIANA FREITAS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

JULIANO SMANIOTO BARIN
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

MARIA ALICE BÖCKELMANN
Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda

MARIA DO CARMO VASQUEZ GARCIA
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde -
INCQS / FIOCRUZ

VALÉRIA PEREIRA DE SOUSA
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

GRUPOS DE TRABALHO

MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS ALTERNATIVOS

CLÉVIA FERREIRA DUARTE GARROTE -
Coordenadora
Universidade Federal de Goiás – UFG

ADRIANA BUGNO
Instituto Adolfo Lutz

ALBA VALÉRIA SANTOS
Hospira

ANDRÉ LUIZ JOCHEN
Associação Brasileira dos Produtores de Soluções
Parenterais – ABRASP

CLÁUDIO KIYOSHI HIRAI
Biolab Sanus Farmacêutica Ltda

DENISE FERREIRA LEITE
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

FLÁVIA MORAIS FLAVIO
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

IEDA MARIA SAPATEIRO TORRES
Universidade Federal de Goiás – UFG

KATIA ANDREA DOMINGOS DE MORAIS
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

LIANA TIEKO EVANGELISTA KUSANO
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa
RONALDO LÚCIO PONCIANO GOMES
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

SILÉSIA DE SOUZA AMORIM
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI
Universidade de São Paulo

COLABORADORES DO PRIMEIRO SUPLEMENTO

ANDRÉ AUGUSTO GOMES FARACO
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

HARÉM OLIVEIRA ROCHA
Unieuro

LEONARDO FÁBIO COSTA FILHO
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa
NATÁLIA CARVALHO GUIMARÃES
Universidade de Brasília – UnB

SANDRO AUGUSTO MOREIRA
Laboratório Farmacêutico Hypermarcas



CAPITULO 4 - GENERALIDADES

Miscibilidade

O termo miscível é empregado para descrever um líquido ou gás que produza uma mistura homogênea ao ser misturado em qualquer proporção com o solvente indicado no mesmo estado físico.

Solubilidade

A solubilidade indicada não deve ser considerada estritamente como constante física, mas como complemento dos demais ensaios, podendo ter um valor definitivo no caso de que a substância não apresenta a solubilidade mínima exigida, principalmente quando o solvente é a água.

As indicações sobre a solubilidade a qual se faz referência são realizadas à temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$.

A expressão *partes* se refere ao número de mililitros de solvente por grama de sólido a ser dissolvido.

As solubilidades aproximadas estabelecidas nas monografias são designadas em termos descritivos, cujos significados estão relacionados na tabela a seguir:

Tabela 1: Termos descritivos de solubilidade e seus significados.

Termo descritivo	Volumes aproximados de solvente em mililitros por grama de substância
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Moderadamente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10000 partes

5.2.2 FAIXA OU TEMPERATURA DE FUSÃO

A *Temperatura* ou *Ponto de fusão* de uma substância é definida como a temperatura na qual esta se encontra completamente fundida. É uma propriedade intrínseca das substâncias, que é utilizada, junto a outros ensaios, para a confirmação da identidade das mesmas, assim como indicador de pureza. No caso de substâncias que fundem com decomposição, a temperatura ou ponto de fusão será a temperatura na qual se inicia a fusão.

Faixa de fusão de uma substância é definida como a faixa compreendida entre a temperatura na qual a substância começa a se fluidificar ou formar gotas nas paredes do tubo capilar e a temperatura na qual a substância está completamente fundida.

Uma transição da fusão pode ser instantânea para um material altamente puro, mas geralmente se observa um intervalo desde o começo até o final do processo. Existem diferentes fatores que influenciam nesta transição e devem ser padronizados quando se descreve o procedimento. Estes fatores incluem: quantidade da amostra, tamanho das partículas, eficiência na difusão do calor e a velocidade do aquecimento, entre outros.

Para os fins farmacopeicos, o ponto de fusão ou faixa de fusão é informado como a temperatura na qual se observa a primeira fase líquida e a temperatura na qual não há mais fase sólida aparente, exceto para aquelas substâncias que se fundem com decomposição ou se especifique de outra maneira na monografia individual.

Método 1

Para amostras que são facilmente reduzidas a pó.

Aparato I

Consiste de um recipiente de vidro (C) para um banho de líquido transparente, um dispositivo misturador (D), um termômetro (A) e uma fonte de calor adequados (ver **Figura 1**). De acordo com a temperatura de trabalho requerida, o líquido do banho pode ser um dos seguintes ou outro que seja apropriado:

- Água para temperaturas até 60 °C;
- Glicerol para temperaturas até 150 °C;
- Parafina líquida de alta faixa de ebulição para temperaturas até 250 °C;
- Óleo de sésamo ou um óleo siliconado de grau adequado para temperaturas até 300 °C.

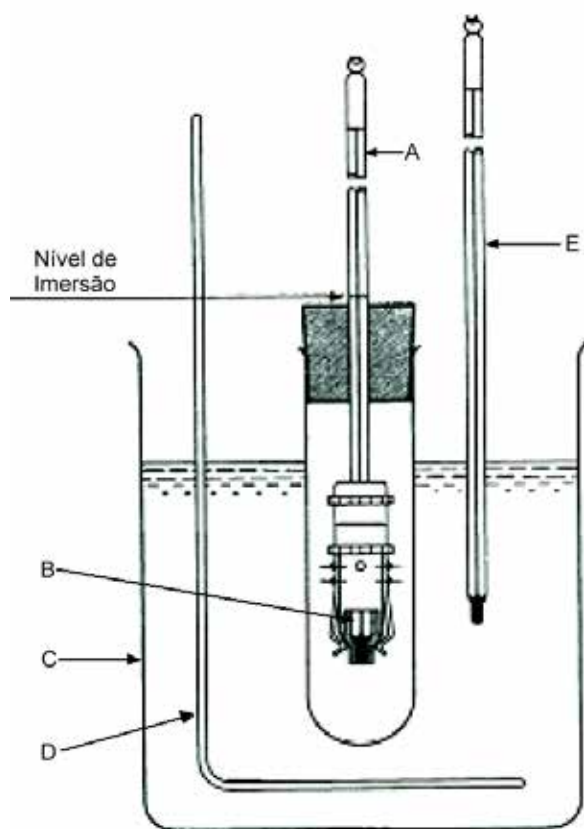


Figura 1 – Aparato I para determinação do ponto de fusão.

O líquido do banho deve ter profundidade suficiente para permitir a imersão do termômetro à profundidade especificada, de modo que o bulbo fique aproximadamente a 2 cm do fundo do banho. O calor pode ser fornecido por uma chama ou eletricamente. O tubo capilar tem aproximadamente 10 cm de comprimento e entre 0,8 e 1,2 mm de diâmetro interno, com paredes de 0,1 a 0,3 mm de espessura e fechado em uma das suas extremidades, a não ser que se especifique de outra forma na monografia individual. Deve ser utilizado um dispositivo agitador que garanta a homogeneidade da temperatura no banho.

Procedimento

A não ser que se especifique de outro modo na monografia individual, proceder como está indicado a seguir:

Reduzir a amostra a pó fino e secá-la em um dessecador a vácuo sobre um agente dessecante apropriado durante 24 horas.

Carregar o tubo capilar seco com suficiente quantidade do pó até formar uma coluna de 3 a 4 mm de altura, logo após ter comprimido por meio de golpes moderados sobre uma superfície sólida. Unir o tubo capilar ao termômetro, ambos umedecidos com o líquido do banho. Ajustar sua altura, de modo que a amostra contida no capilar fique junto ao bulbo do termômetro (B).

Adaptar um termômetro auxiliar (E) de modo que o centro do bulbo fique o mais próximo possível da haste do termômetro principal (A) em um ponto equidistante da superfície do banho e da divisão correspondente ao ponto de fusão esperado.

Aquecer o banho até alcançar uma temperatura de 10 °C abaixo do ponto de fusão esperado. Introduzir o termômetro com o capilar aderido e continuar o aquecimento de maneira tal que a temperatura se eleve a uma velocidade de 1 a 2 °C por minuto, dependendo da estabilidade da substância.

Registrar a leitura do termômetro auxiliar ao final da fusão da amostra e, se for necessário, aplicar a correção pela coluna emergente empregando a seguinte fórmula:

$$t_c = k \times N(T - t)$$

em que:

- t_c é a correção que deve ser adicionada à temperatura de fusão observada;
- k é a constante de correção pelo coeficiente de dilatação do líquido do termômetro. No caso do mercúrio o valor é 0,00016;
- N é o número de graus da coluna do termômetro principal entre o nível do banho e a temperatura de fusão observada;
- T é a temperatura de fusão;
- t é a temperatura registrada pelo termômetro auxiliar.

Realizar a determinação pelo menos em triplicata. Para isso, deixar resfriar o banho até 10 °C abaixo do ponto de fusão ou até uma temperatura inferior e repetir o procedimento empregando novas porções da amostra.

Aparato II

Consta de um bloco metálico que pode ser aquecido à velocidade controlada, cuja temperatura pode ser monitorada por um sensor ou termômetro. O bloco permite que nele seja inserido o tubo capilar que contém a substância em ensaio e monitorar o processo de fusão por meio de controle visual ou automaticamente.

Procedimento

A não ser que se especifique de outro modo na monografia individual, proceder como está indicado a seguir:

Reduzir a amostra a pó fino e secá-la em um dessecador a vácuo sobre um agente dessecante apropriado durante 24 horas.

Carregar o tubo capilar seco com suficiente quantidade do pó até formar uma coluna de 3 a 4 mm de altura, logo após ter comprimido por meio de golpes moderados sobre uma superfície sólida.

Aquecer o bloco rapidamente até uma temperatura de 10 °C abaixo do ponto de fusão esperado e continuar o aquecimento de tal maneira que a temperatura se eleve a uma velocidade de 1 a 2 °C por minuto. Introduzir o capilar no bloco e registrar a temperatura no início e no final da fusão.

Realizar a determinação pelo menos em triplicata. Para isso, deixar resfriar o bloco até 10 °C abaixo do ponto de fusão ou até uma temperatura inferior, e repetir o procedimento empregando novas porções da amostra.

Método 2

Para amostras que não são facilmente reduzidas a pó.

Procedimento

Fundir cuidadosamente a amostra à temperatura mais baixa possível e introduzir o material fundido em um capilar aberto em ambas as extremidades até formar uma coluna de uns 10 mm de altura. Esfriar o capilar carregado a uma temperatura igual ou menor que 10 °C durante aproximadamente 24 horas. Unir o capilar ao termômetro e ajustar sua altura, de modo que a amostra contida no capilar fique próxima ao bulbo do termômetro. Introduzir em um banho de água e aquecer como se indica no *Método 1 Aparato 1*, exceto que ao chegar a uma temperatura aproximadamente de 5 °C abaixo do ponto de fusão esperado, se aumenta a temperatura a uma velocidade de 0,5 °C por minuto. Registra-se como ponto de fusão a temperatura na qual a amostra começa a subir dentro do tubo capilar. Realizar a determinação pelo menos em triplicata utilizando porções diferentes da amostra.

Método 3

Para vaselina, substâncias graxas ou outras de consistência pastosa (semisólida).

Procedimento

Fundir a amostra sob agitação até alcançar uma temperatura entre 90 e 92 °C e deixar resfriar a substância fundida até uma temperatura entre 8 e 10 °C acima do ponto de fusão esperado. Resfriar até 5 °C o bulbo do termômetro, secar e, enquanto ainda está frio, submergir na amostra fundida até a metade do bulbo

aproximadamente. Retirar imediatamente e manter em posição vertical até que a superfície da amostra depositada sobre o bulbo solidifique. Introduzir em banho-maria a uma temperatura que não exceda os 16 °C durante aproximadamente 5 minutos.

Adaptar o termômetro dentro de um tubo de ensaio por meio de uma rolha perfurada, de modo que seu extremo inferior fique cerca de 15 mm acima do fundo do tubo. Suspender o tubo de ensaio em banho-maria a uma temperatura de 16 °C e elevar a temperatura do banho até 30 °C, a uma velocidade de 2 °C por minuto, e logo a seguir a uma velocidade de 1 °C por minuto até que a primeira gota se desprenda do termômetro. A temperatura em que isso ocorre é o ponto de fusão. Para cada determinação empregar uma porção recém-fundida da amostra. Realizar a determinação em triplicata. Se a diferença máxima entre as determinações for menor que 1 °C, determinar a média dos valores obtidos. Do contrário, realizar outras duas determinações e calcular a média das cinco.



5.2.8 DETERMINAÇÃO DE ROTAÇÃO ÓPTICA

A rotação óptica é a propriedade que apresentam algumas substâncias líquidas ou solutos em solução de girar o plano de polarização da luz polarizada que sobre elas incide.

Esta propriedade é característica de muitas substâncias que apresentam centros quirais, constituídos muito frequentemente por átomos de carbono com quatro substituintes diferentes (centro assimétrico). O número máximo de isômeros ópticos possíveis de uma molécula é de 2^n , sendo n o número de centros assimétricos.

As substâncias que giram o plano de polarização no sentido dos ponteiros do relógio são denominadas de dextrógiras ou isômeros ópticos (+), enquanto que as que giram o plano de polarização na direção oposta são denominadas de levógiras ou isômeros ópticos (-) (os símbolos d- e l- que anteriormente eram usados para indicar isômeros dextro- e levo- não são mais utilizados, devido à confusão com os símbolos D- e L- que se referem às configurações relacionadas com o D-gliceraldeído. Os símbolos R e S assim como α e β também são empregados para indicar a configuração, ou seja, o ordenamento espacial dos átomos ou grupos de átomos).

As substâncias quirais cujas moléculas não são superponíveis, mas são imagens especulares, são

denominadas enantiômeros. Estes têm as mesmas propriedades físico-químicas (densidade, índice de refração, momento dipolo-dipolo, pontos de ebulição e fusão), exceto que giram o plano de luz polarizada na mesma quantidade de graus em direções opostas, e suas reações com outras substâncias quirais apresentam características diferentes.

A polarimetria é uma técnica conveniente para diferenciar entre si os isômeros opticamente ativos a partir da medida da rotação óptica de uma substância; também é um critério importante de identidade e pureza enantiomérica, podendo ser empregada com fins quantitativos.

A rotação óptica varia com a temperatura, o comprimento de onda da luz incidente, o solvente utilizado, a natureza da substância e sua concentração. Se uma solução contém duas substâncias opticamente ativas e estas não reagem entre si, o ângulo de desvio será a soma algébrica dos ângulos de desvio de ambas.

POLARÍMETRO

Os polarímetros são aparelhos que detectam a rotação óptica de modo visual (ao igualar a intensidade da luz sobre dois campos) ou por meio de um sistema fotoelétrico, sendo estes últimos mais exatos e precisos que os de medição visual.

A medição da rotação óptica deve ser realizada empregando um polarímetro capaz de medir diferenças de, no mínimo, $0,05^\circ$, a não ser que seja especificado de forma diferente na monografia individual. Como fonte de luz se empregam lâmpadas de sódio, vapor de mercúrio, xenônio ou halogênio-tungstênio, entre outras, providas de um dispositivo que permite transmitir um feixe de luz monocromática. Estas duas últimas lâmpadas mencionadas costumam ser menos dispendiosas, além de possuírem maior durabilidade, e terem uma ampla faixa de comprimentos de onda de emissão em relação às fontes de luz tradicionais. A escala deve ser controlada utilizando um padrão de referência de polarização que consiste em placas de quartzo certificadas. A linearidade da escala deve ser verificada periodicamente por meio de uma solução de materiais de referência padrão de dextrose e sacarose.

O emprego de comprimentos de ondas mais baixos, como por exemplo, as linhas de lâmpada de mercúrio a 578, 546, 436, 405 e 365 nm em um polarímetro fotoelétrico, podem proporcionar vantagens quanto à sensibilidade, com a consequente redução da concentração da substância no ensaio. Em geral, a rotação óptica observada em 436 nm é aproximadamente o dobro e a 365 nm é aproximadamente três vezes maior que a 589 nm.

A redução da concentração da substância sob ensaio, requerida para a medida, às vezes pode ser conseguida por meio de sua conversão em outra substância que possua uma rotação óptica significativamente maior.

A rotação óptica também é afetada pelo solvente empregado na medição e este deve ser especificado em todos os casos.

PROCEDIMENTO

A rotação óptica específica é um valor de referência e é calculado a partir da rotação óptica observada para uma solução da amostra ou para o líquido de acordo com o especificado na monografia. As medidas de rotação óptica são realizadas a 589,3 nm a 25°C , a não ser que seja especificado de forma diferente na monografia individual. A temperatura experimental deve ser mantida em $\pm 0,5^\circ\text{C}$ em relação ao valor especificado.

Quando se emprega um polarímetro com detecção visual, deve ser utilizada a média entre pelo menos cinco determinações, corrigidas pela leitura do branco do solvente, no caso de soluções, e o ar, no caso de líquidos. Quando empregar um polarímetro fotoelétrico, realizar uma só medida corrigida pelo branco do solvente, no caso de soluções, e o ar, no caso de líquidos. Usar o mesmo tubo do polarímetro na mesma orientação para a amostra e o branco.

A rotação óptica das soluções deve ser determinada em até 30 minutos após sua preparação. No caso de substâncias que podem sofrer racemização ou mutarrotação, deve haver cuidado especial na padronização do tempo entre o qual se prepara a solução e se realiza a leitura polarimétrica.

A menos que se indique de outro modo na monografia correspondente, a rotação específica é calculada sobre a substância seca quando a monografia determina a *Perda por dessecação*, sobre a substância anidra quando se especifica *Determinação de água*, ou livre de solventes quando se especifica *Conteúdo de solventes residuais*.

A exatidão e precisão das medidas de rotação óptica podem ser ampliadas se forem tomadas as seguintes precauções:

- 1) Deve-se evitar a formação de bolhas de ar durante o enchimento do tubo do polarímetro, o que é particularmente necessário para tubos micro e semi-micro.

As amostras de substâncias líquidas ou sólidas dissolvidas devem ser homogêneas e límpidas.

Os elementos ópticos devem estar perfeitamente alinhados, bem como a fonte de luz em relação ao caminho óptico.

CÁLCULOS

Rotação óptica específica: é calculada a partir da rotação óptica observada na solução amostra, obtida conforme especificado na monografia correspondente.

Calcular a rotação óptica específica utilizando as seguintes fórmulas:

Para líquidos $[\alpha]_D^{25} = \alpha / ld^{25}$

Para substâncias em solução $[\alpha]_D^{25} = 100 \alpha / lc$

em que:

α = rotação observada corrigida, em graus a 25 °C;

l = comprimento do tubo do polarímetro em decímetros;

d^{25} = densidade relativa do líquido a 25 °C;

c = concentração da substância em percentagem peso/volume;

$[\alpha]_D^{25}$ = rotação óptica específica determinada a 25 °C e 589,3 nm (linha D da luz de sódio).



5.2.9 PERDA POR DESSECAÇÃO

Este ensaio se destina a determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada nas condições especificadas na monografia individual. Para substâncias que têm água como único constituinte volátil é apropriado aplicar o procedimento indicado no capítulo *Determinação de água (5.2.20)*. O resultado se expressa em percentagem p/p, calculado da seguinte forma:

$$\frac{(P_u - P_s)}{P_m} \times 100$$

em que:

P_m = peso da amostra (g);

P_u = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da secagem (g);

P_s = peso do pesa-filtro contendo a amostra depois da secagem (g).

Procedimento

1. Gravimetria

A não ser que se especifique de outra maneira na monografia individual proceder como se indica a seguir:

No caso de ser necessário, reduzir a substância a pó fino triturando-o rapidamente. Pesar uma quantidade aproximada entre 1 a 2 g da substância, de forma exata, em um pesa-filtro previamente dessecado durante 30

minutos, nas mesmas condições que são empregadas no ensaio da amostra, e resfriado à temperatura ambiente em um dessecador.

Distribuir a amostra o mais uniformemente possível, agitando suavemente o pesa-filtro de modo que se forme uma camada de aproximadamente 5 mm de espessura e não mais que 10 mm em caso de materiais volumosos. Colocar o pesa-filtro contendo a amostra, destampado, junto com a tampa na câmara de secagem. Secar a amostra nas condições especificadas na monografia. (Nota: a temperatura especificada na monografia deve ser considerada como compreendida no intervalo de ± 2 °C). Abrir a câmara de secagem, tampar o pesa-filtro rapidamente, retirá-lo e permitir que atinja a temperatura ambiente em um dessecador antes de pesá-lo.

Quando na monografia individual se especificar a dessecação até peso constante, a secagem deverá continuar até que duas pesagens consecutivas não difiram em mais que 0,50 mg por grama de substância pesada, realizando a segunda pesagem depois de uma hora adicional de secagem.

Se a substância funde a uma temperatura inferior àquela especificada para a determinação da perda por secagem, manter o pesa-filtro com seu conteúdo durante 1 a 2 horas a uma temperatura de 5 a 10 °C inferior à temperatura de fusão e depois secar à temperatura especificada.

Para a análise de cápsulas, utilizar uma porção do conteúdo homogeneizado de não menos que quatro unidades. No caso de comprimidos, utilizar o pó de não menos que quatro unidades.

Quando na monografia individual estiver indicado:

- *secagem a vácuo*, deverá ser utilizado um dessecador ao vácuo, uma estufa de secagem ao vácuo ou outro aparato adequado;
- *secar a vácuo em um frasco com tampa munida de perfuração capilar*, deverá ser utilizado um frasco ou tubo com tampa capilar de 225 ± 25 μm de diâmetro e a câmara de aquecimento deverá ser mantida a uma pressão de 5 mm de mercúrio ou menor. Ao final do período de aquecimento, deixar entrar ar seco na câmara, retirar o frasco e, com a tampa ainda no seu lugar, permitir que se resfrie até a temperatura ambiente em um dessecador antes de pesar;
- *secagem em um dessecador*, deverão ser tomadas as precauções necessárias para garantir que o agente dessecante se mantenha ativo. Dentre os agentes dessecantes mais frequentes estão o cloreto de cálcio, sílica gel e pentóxido de fósforo.

2. Termogravimetria

No caso em que a monografia individual especificar que a perda por dessecação deva ser realizada por análise termogravimétrica, proceder como está especificado no capítulo *Análise térmica (5.2.27)*.

3. Balança infravermelha ou com lâmpada halógena.

No caso em que a monografia individual especificar que a perda por dessecação deva ser realizada com balança infravermelha ou com lâmpada halógena, proceder como se indica a seguir:

- Retirar a umidade do equipamento;
- Pesar a quantidade da substância a ser analisada e distribuir uniformemente o material no coletor de amostra, e colocá-lo dentro do aparato;
- Definir o tempo e a temperatura de secagem como estiver estabelecido na monografia individual. Registrar o valor da umidade obtido.



5.2.10 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO POR INCINERAÇÃO (CINZAS SULFATADAS)

Resíduo por incineração (cinzas sulfatadas) é o resíduo não volátil de uma amostra incinerada na presença de ácido sulfúrico. Este ensaio é utilizado para determinar o conteúdo de impurezas inorgânicas presentes em uma substância orgânica. Esta técnica também é utilizada para a determinação de componentes inorgânicos em misturas e de impurezas presentes em substâncias inorgânicas termolábeis.

Procedimento

Pesar exatamente entre 1 a 2 g da amostra ou a quantidade especificada na monografia, em um cadinho apropriado (quartzo, sílica, platina ou porcelana, a menos que se especifique outro material na monografia individual) previamente submetido à incineração à temperatura especificada para a amostra durante 30 minutos, resfriado em dessecador e pesado. Umedecer a amostra com aproximadamente 1 mL de ácido sulfúrico R, aquecer suavemente à temperatura tão baixa quanto possível até a carbonização da amostra. Resfriar e umedecer o resíduo com 1 mL de ácido sulfúrico R, a menos que se especifique de outro modo na monografia individual. Aquecer suavemente até que não sejam desprendidos fumos brancos e carbonizar imediatamente. Incinerar a 600 ± 50 °C entre 2 e 3 horas, a menos que se especifique outra temperatura e/ou tempo na monografia individual. Resfriar em um dessecador, pesar e calcular a percentagem do resíduo. A menos que seja especificada de outra maneira na monografia individual, se o resíduo obtido exceder o limite especificado, adicionar 1 mL de ácido sulfúrico R, aquecer e incinerar por 30

minutos adicionais. Repetir este procedimento até que a diferença entre duas pesagens consecutivas não seja maior que 0,5 mg ou até que o resíduo cumpra com o limite estabelecido na monografia individual.

Calcular a percentagem do resíduo em relação à substância em análise utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ resíduo por incineração (cinzas sulfatadas)} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100$$

em que:

P_1 = peso do cadinho depois da calcinação e resfriamento (em gramas);

P_2 = peso do cadinho com a amostra depois da calcinação e resfriamento (em gramas);

P_3 = peso inicial da amostra (em gramas);

100 = fator de porcentagem.

Realizar este procedimento sob capela exaustora bem ventilada, mas protegida das correntes de ar. Pode ser empregado um forno mufla, se desejado, e seu uso é recomendado para a ignição final a 600 ± 50 °C.

Comprovar a exatidão da medição e o sistema de circuitos do forno mufla mediante o controle da temperatura em diferentes pontos do forno mufla. A variação de temperatura tolerada é de ± 25 °C para cada ponto avaliado.

5.2.17.4 CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária sólida, contida em uma coluna cilíndrica. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. A CLAE apresenta vantagens sobre a cromatografia a gás para as análises de combinações orgânicas. Amostras não voláteis e termolábeis são, preferencialmente, analisadas por CLAE. A maioria das análises farmacêuticas está baseada no método de separação por partição e devem ocorrer em tempo curto de análise. Vários fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica, os quais dependem da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e vazão da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária.

APARELHAGEM

O equipamento utilizado consiste em um reservatório que contém a fase móvel, uma bomba com a finalidade de impelir a fase móvel pelo sistema cromatográfico, um injetor para introduzir a amostra no sistema, uma coluna cromatográfica, um detector e um dispositivo de captura de dados, como um *software*, integrador ou registrador. Além de receber e enviar informações para o detector, *softwares* são utilizados para controlar todo o sistema cromatográfico, proporcionando maior operacionalidade e logística de análise.

Os sistemas cromatográficos modernos consistem de bombas para pressurizar a fase móvel, controladas por *software*, que podem ser programadas para variar a relação de componentes da fase móvel, como é requerido para cromatografia por gradiente de solvente, ou para misturar, de forma isocrática, a fase móvel (fases móveis com relação fixa de solventes). Pressões operacionais de até 5000 psi (cerca de 345 bar) e vazão de até 10 mL por minuto podem ser utilizadas. Pressões superiores ficam condicionadas a evolução do instrumental.

Após dissolver a amostra na fase móvel ou em outro solvente adequado, a solução é injetada no sistema cromatográfico, de forma manual, utilizando seringa apropriada, ou por meio de um injetor ou amostrador automático. Este consiste em um carrossel ou bandeja, capaz de acomodar diversos frascos contendo as amostras. Alguns amostradores automáticos podem ser programados para injetar diferentes volumes de amostra, diversas quantidades de injeções, controlar o intervalo entre injeções e outras variáveis operacionais.

Quando se trabalha a altas pressões, uma válvula de injeção é essencial. Essa apresenta um sistema calibrado, com volume definido, denominado anel de injeção ou alça de amostragem, que será preenchido com a solução a ser analisada e, posteriormente, transferida à coluna.

Para a maioria das análises farmacêuticas, a separação é alcançada por partição dos componentes, presentes na solução a ser analisada, entre as fases móvel e estacionária. Sistemas que consistem de fases estacionárias polares e fases móveis apolares são definidos como *cromatografia em fase normal*, enquanto o oposto, fases móveis polares e fases estacionárias apolares, são denominados de *cromatografia em fase reversa*. A afinidade de uma substância pela fase estacionária e, conseqüentemente, seu tempo de retenção na coluna, é controlado pela polaridade da fase móvel.

As fases estacionárias utilizadas em *cromatografia em fase reversa* consistem, tipicamente, de uma molécula orgânica quimicamente ligada às partículas de sílica ou outros suportes, como grafita porosa. O diâmetro das partículas é de, normalmente, 3 µm a 10 µm. Quanto menores o diâmetro da partícula e a película que recobre o suporte, mais rápida e eficiente será a transferência das substâncias entre as fases estacionárias e móveis. A polaridade da coluna depende dos grupos funcionais presentes, sendo os mais comuns os grupos apolares

octil, octadecil, fenil, cianopropil e polar, *nitrila*. A proporção de grupos silanóis não ligados ao grupo funcional influencia, significativamente, na eficiência da separação cromatográfica e no formato do pico eluído. Comercialmente, estão disponíveis colunas cromatográficas com diferentes qualidades de fases estacionárias, inclusive aquelas com pequena proporção de grupos silanóis livres, denominadas *capeadas*. Geralmente, colunas de sílica em fase reversa apresentam vida útil na faixa de pH de 2 a 8, entretanto, colunas contendo grafita porosa ou materiais poliméricos, como o estireno-divinilbenzeno, são estáveis em uma faixa mais ampla de pH. De forma menos comum, podem ser utilizados líquidos, não ligados, como revestimento do suporte de sílica e, portanto, devem ser imiscíveis com a fase móvel. As colunas normalmente usadas para separações analíticas têm diâmetros internos de 1 mm a 5 mm. Essas podem ser aquecidas, proporcionando separações mais eficientes, mas só raramente são utilizadas temperaturas superiores a 60 °C, devido ao potencial de degradação da fase estacionária ou à volatilidade da fase móvel. A menos que especificado na monografia da substância a ser analisada, as colunas são utilizadas em temperatura ambiente.

Os detectores mais frequentemente utilizados em cromatografia a líquido de alta eficiência são os espectrofotométricos (UV/Vis). Os detectores espectrofotométricos são utilizados para detectar compostos com grupamento **cromóforo**. Tais detectores consistem de uma célula de fluxo localizada no término da coluna cromatográfica. A radiação ultravioleta atravessa, constantemente, pela célula de fluxo e é recebida no detector. Com o sistema em funcionamento, as substâncias são eluídas da coluna, passam pela célula de detector e absorvem a radiação, resultando em alterações mensuráveis no nível de energia. Esses detectores podem apresentar comprimento de onda fixo, variável ou múltiplo. Detectores de comprimento de onda fixo operam em um único valor, tipicamente 254 nm, emitido por uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão. Aqueles com comprimento de onda variável contêm uma fonte contínua de emissão, como uma lâmpada de deutério ou xenônio de alta pressão, e um monocromador ou um filtro de interferência, de modo a gerar radiação monocromática a um valor selecionado pelo operador, podendo, ainda, ser programados para alterar o comprimento de onda durante o desenvolvimento da análise. Os detectores de comprimento de onda múltiplo medem, simultaneamente, a absorvância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados de detectores de arranjo de diodos (DAD). Nestes, a radiação ultravioleta é transmitida através da célula de fluxo, absorvida pela amostra e então separada em seus componentes originais, que são detectados, individualmente, pelo detector de fotodiodos, registrando dados de absorvância em toda a faixa do espectro do ultravioleta e visível e, adicionalmente, os espectros de cada pico registrado no cromatograma.

Os detectores de índice de refração medem a diferença entre o índice de refração da fase móvel pura e da

fase móvel contendo a substância a ser analisada. São utilizados para detectar substâncias que não absorvem no ultravioleta ou visível, entretanto são menos sensíveis que os detectores espectrofotométricos. Os detectores de índice de refração apresentam a desvantagem de serem sensíveis a pequenas mudanças da composição dos solventes da fase móvel, taxa de fluxo e temperatura.

Os detectores fluorimétricos são utilizados para detectar compostos com grupamento **fluoróforo** ou que podem ser convertidos em derivados fluorescentes, por transformação química ou adicionando reagentes fluorescentes a grupos funcionais específicos. Se a reação química é requerida, pode-se realizá-la no momento da preparação da amostra ou, alternativamente, o reagente pode ser introduzido na fase móvel, com a reação ocorrendo antes da detecção.

Os detectores potenciométricos, voltamétricos ou eletroquímicos são úteis para quantificação de substâncias que podem ser oxidadas ou reduzidas em um eletrodo. Esses detectores são altamente seletivos, sensíveis e seguros, mas requerem fases móveis livres de oxigênio e íons de metais redutíveis. Uma bomba de fluxo contínuo deve ser utilizada, assegurando que o pH, a força iônica, e a temperatura da fase móvel permanecem constantes. Detectores eletroquímicos com eletrodo específicos de carbono podem ser utilizados, vantajosamente, para quantificar nanogramas de substâncias facilmente oxidáveis, como fenóis e catecóis.

Os detectores de espectrometria de massas têm a capacidade de medir a massa molar de uma substância, combinados com a cromatografia a líquido proporcionam uma alta seletividade uma vez que picos não resolvidos podem ser isolados monitorando-se um valor de massa selecionado. Esses detectores podem ser de quadrupolo simples (MS) ou tandem (MS/MS), quando associados, para exemplificar alguns dos modelos utilizados. As fontes de ionização mais comuns são os do tipo “ionização por eletrospray” (ESI) e a “ionização química a pressão atmosférica” (APCI).

Os detectores de condutividade têm aplicação na cromatografia de troca iônica e medem a condutividade da fase móvel continuamente que é modificada com a presença de analitos na célula.

Atualmente, sistemas de coleta de dados modernos estão disponíveis com as funções de receber e armazenar os sinais provenientes do detector e, posteriormente, proporcionar o manejo dessas informações, gerando os cromatogramas com os dados de área e altura do pico, identificação da amostra e métodos. As informações também podem ser coletadas em sistemas simples de gravação de dados, como registradores, para a garantia da integridade dos dados gerados.

PROCEDIMENTO

O comprimento e o diâmetro interno da coluna, o tipo e o tamanho das partículas da fase estacionária, a

temperatura da operação, a composição e a vazão da fase móvel e o tipo de detecção são descritos nas monografias individuais.

A composição da fase móvel tem influência significativa na performance cromatográfica e na separação das substâncias presentes na solução a ser analisada. Para uma análise quantitativa precisa, reagentes de elevado grau de pureza ou solventes orgânicos de pureza cromatográfica devem ser utilizados. A água, de qualidade adequada, deve apresentar baixas condutividade e absorção na faixa do ultravioleta. Na cromatografia de partição, o coeficiente de partição e, conseqüentemente, a separação podem ser modificados pela adição de outro solvente à fase móvel. Na cromatografia de troca-iônica, a retenção das substâncias é afetada pelo pH, pela força iônica e por outras modificações na composição da fase móvel. A técnica de modificar continuamente a composição dos solventes da fase móvel durante a corrida cromatográfica é denominada de eluição gradiente, e é aplicada para separar misturas complexas de substâncias com diferentes fatores de capacidade. Entretanto, detectores que são sensíveis a modificações na composição da fase móvel, como os refratômetros, têm sua utilização limitada com a técnica de eluição gradiente.

O detector deve apresentar uma ampla faixa de atuação e as substâncias a serem analisadas devem estar separadas de qualquer interferente. A faixa linear para uma substância é aquela na qual a resposta do detector é diretamente proporcional à sua concentração.

Os sistemas de CLAE são calibrados comparando-se as respostas dos picos obtidos com as respectivas concentrações de substâncias químicas de referência (SQR). Resultados quantitativos confiáveis são obtidos por meio de calibração com padrão externo, quando injetores ou amostradores automáticos são preferencialmente utilizados. Esse método envolve a comparação direta das respostas obtidas com os picos, separadamente analisados, das soluções padrão e amostra. Nos casos em que a padronização externa é utilizada, os cálculos podem ser realizados segundo a equação:

$$Ca = Cp(Ra / Rp)$$

em que

Ca = concentração da solução amostra;

Cp = concentração da solução padrão;

Ra = resposta (área ou altura) do pico da solução amostra;

Rp = resposta (área ou altura) do pico da solução padrão.

Se a injeção é realizada por meio de seringa, melhores resultados quantitativos são obtidos por meio de calibração com padrão interno, adicionando-se uma quantidade conhecida de uma substância química de referência não interferente às soluções padrão e amostra.

A relação das respostas obtidas com a substância a ser analisada e com o padrão interno é utilizada para expressar o resultado quantitativo. Nos casos em que a padronização interna é utilizada, os cálculos podem ser realizados segundo a equação:

$$Ca = Cp \frac{Ra / Rai}{Rp / Rpi}$$

em que

Rai = resposta (área ou altura) do pico do padrão interno na solução amostra;

Rpi = resposta (área ou altura) do pico do padrão interno na solução padrão.

Devido a variações normais entre equipamentos, solventes, reagentes e técnicas, é necessário um teste

de adequação do sistema para assegurar que o método descrito seja aplicado de forma irrestrita. Os principais parâmetros da adequação do sistema estão descritos em *Interpretação dos cromatogramas* e em *Adequação do sistema*.

INTERPRETAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

Na **Figura 1**, é representada uma separação cromatográfica típica de duas substâncias, sendo t_1 e t_2 os respectivos tempos de retenção. Os termos h , $h/2$ e $W_{h/2}$ correspondem à altura, à meia altura e à largura a meia altura, respectivamente, e W representa a largura do pico na linha de base, pelo método da triangulação. O sinal relativo ao tempo morto, t_0 , refere-se a uma substância não retida na coluna cromatográfica.

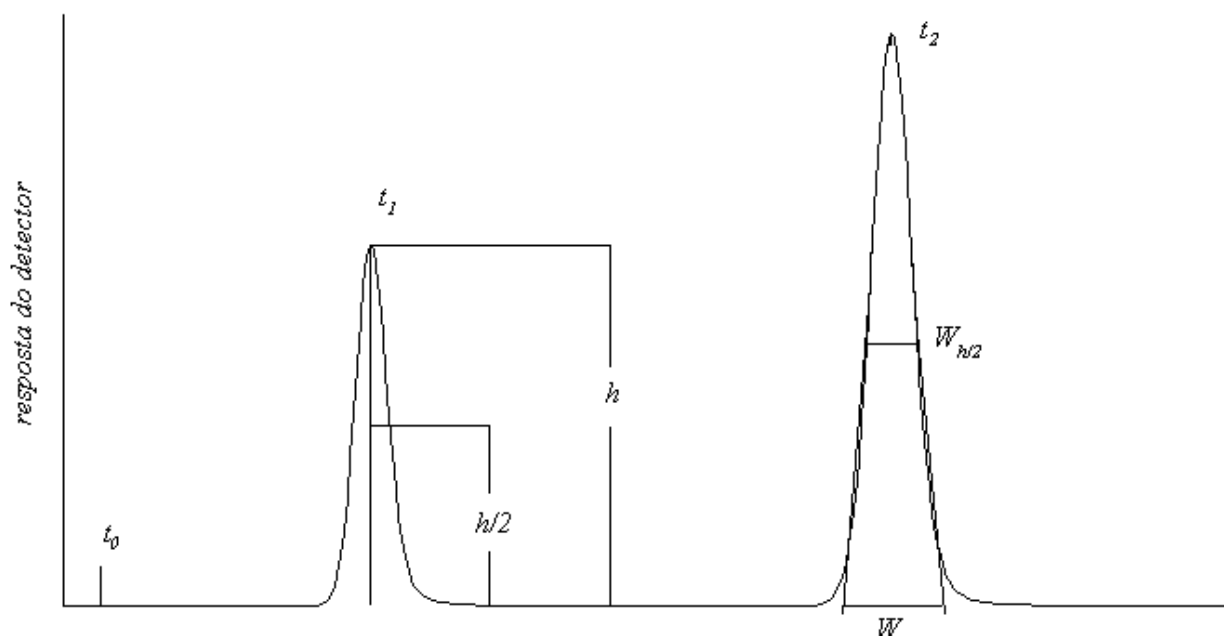


Figura 1 – Separação cromatográfica de duas substâncias.

Tempo de retenção (t), Fator de retenção (k) e Tempo de retenção relativo

O tempo de retenção em cromatografia é característico da substância analisada, entretanto não é exclusivo. A comparação entre os tempos de retenção da amostra e da substância química de referência pode ser utilizada como indicativo da identidade da substância, porém é insuficiente para garantir a total caracterização da amostra. O tempo de retenção absoluto pode variar entre equipamentos e conforme o uso de solventes e reagentes diferentes. Nesse sentido, as comparações são feitas em termos de fator de retenção, k , calculado segundo a expressão:

$$k = \frac{t - t_0}{t_0}$$

em que

t = tempo de retenção da substância analisada;

t_0 = tempo morto.

O fator de retenção, k , é a razão entre a quantidade da substância com afinidade pela fase estacionária e a quantidade com afinidade pela fase móvel. Quanto maior a afinidade da substância pela fase estacionária maior a sua retenção.

O conceito de tempo de retenção relativo também pode ser aplicado. Para tanto, deve-se definir uma substância, de uma mistura, como a principal. Essa terá o tempo de retenção relativo de 1. Todas as outras substâncias terão seus tempos de retenção relacionados com o tempo de retenção da substância principal.

Número de pratos teóricos (N)

O número de pratos teóricos, N , é indicativo da eficiência da coluna. Pode ser expresso em números de pratos teóricos por coluna ou número de pratos teóricos por metro. Para picos com formato gaussiano, o número de pratos teóricos por coluna é calculado segundo as expressões:

$$N = 16 \times \left(\frac{t}{W} \right)^2 \quad \text{ou} \quad N = 5,54 \times \left(\frac{t}{W_{h/2}} \right)^2$$

O valor de N depende da substância a ser analisada e das condições de análise, como fase móvel, temperatura e fase estacionária.

Relação pico/vale (p/v)

A relação pico/vale pode ser empregada como um critério de adequabilidade do sistema em um ensaio de substâncias relacionadas, quando não se busca a separação entre dois picos na linha de base. A **Figura 2** representa uma separação incompleta de duas substâncias, onde h_p é a altura do pico menor acima da linha de base extrapolada, e h_v é a altura no ponto mais baixo da curva, que separa os picos menor e maior, acima da linha de base extrapolada.

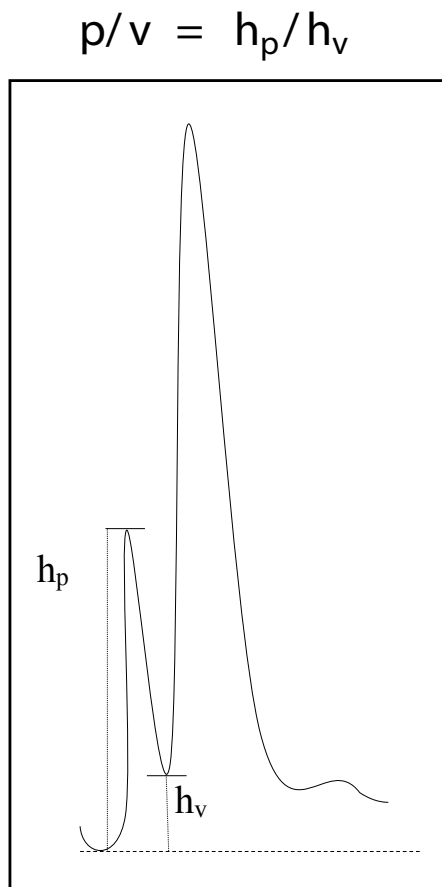


Figura 2 – Determinação da relação pico/vale.

Resolução (R)

A resolução, R , é o parâmetro cromatográfico que indica o grau de separação entre duas substâncias em uma mistura, e é calculada segundo as expressões:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \quad \text{ou} \quad R = 1,18 \frac{(t_2 - t_1)}{(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})}$$

em que

t_2 e t_1 = tempos de retenção das duas substâncias da mistura;

W_1 e W_2 = respectivas larguras dos picos na linha de base, pelo método da triangulação;

$W_{1,h/2}$ e $W_{2,h/2}$ = respectivas larguras dos picos à meia altura.

A área ou a altura do pico são, usualmente, proporcionais à quantidade da substância eluída. A área do pico, geralmente, é mais utilizada, entretanto pode ser menos precisa se houver outros picos interferentes. Para medidas manuais, o gráfico deve ser obtido em velocidade maior que a usual, minimizando os erros na obtenção da largura e da largura à meia altura dos picos. Para a análise quantitativa, as substâncias devem estar totalmente separadas de qualquer substância interferente.

Fator de cauda (T)

O fator de cauda, T , que indica a simetria do pico, apresenta valor igual a 1 quando o pico é perfeitamente simétrico. Esse valor aumenta à medida que a assimetria do pico se torna mais pronunciada. Em alguns casos, valores inferiores a 1 podem ser observados. À medida que a assimetria do pico aumenta, a integração e a precisão se tornam menos confiáveis. O fator de cauda é calculado segundo a expressão:

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

em que

$W_{0,05}$ = largura do pico medida a 5% de sua altura;

f = valor da porção anterior do pico, em relação à largura a 5% da altura, de acordo com a **Figura 3**.

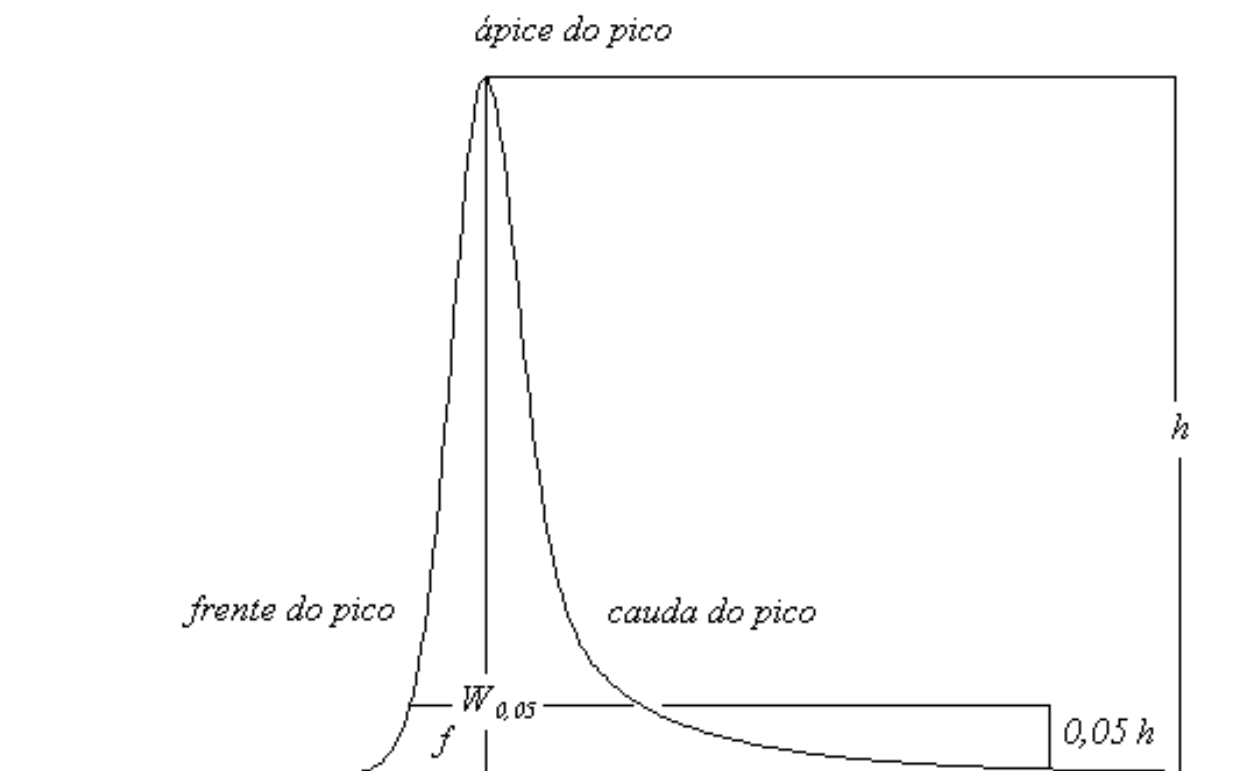


Figura 3 – Cromatograma representando a assimetria do pico.

ADEQUABILIDADE DO SISTEMA

Os testes de adequabilidade do sistema são parte integrante dos métodos de cromatografia a líquido. São aplicados com a finalidade de verificar se a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico estão adequadas para as análises a serem realizadas. Os principais parâmetros necessários para a verificação da adequabilidade do sistema são descritos a seguir.

A resolução, R , é função da eficiência da coluna, N , e é especificada para garantir que substâncias eluídas proximamente, apresentem separação satisfatória sem interferências mútuas.

Replicatas de injeções da solução padrão são trabalhadas, estatisticamente, para verificar se os requerimentos para a precisão da análise foram atingidos. A menos que especificado na monografia individual, são utilizados os dados de cinco replicatas de injeções para calcular o desvio padrão relativo (DPR), se a especificação for igual ou inferior a 2,0%. Se o desvio padrão relativo especificado for superior a 2,0%, os dados de seis replicatas devem ser utilizados.

O fator de cauda, T , que indica a simetria do pico, é igual a 1 para picos perfeitamente simétricos e maior que 1 para picos que apresentam assimetria. Em alguns casos, valores menores que 1 podem ser observados.

Esses testes são realizados após coletar os resultados de replicatas de injeções da solução padrão ou outra solução especificada na monografia individual. A

especificação desses parâmetros cromatográficos, em uma monografia, não impede a modificação das condições de análise. Ajustes nas condições de trabalho, de forma a atingir os parâmetros de adequabilidade do sistema, podem ser necessários. A menos que especificado na monografia individual, os parâmetros de adequabilidade do sistema são determinados a partir dos dados obtidos com o pico da substância de interesse. A precisão do sistema, demonstrada por meio de replicatas da solução padrão, deve ser alcançada antes das injeções das soluções amostras. A adequabilidade do sistema deve ser verificada durante toda a análise cromatográfica, por injeção de solução padrão em intervalos de tempo apropriados. Quando houver mudança significativa no equipamento ou em um reagente, os testes de adequabilidade do sistema devem ser realizados antes das injeções da amostra. A análise não será válida a menos que os requerimentos do teste de adequabilidade do sistema sejam alcançados.

AJUSTES DE CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS EM SISTEMAS ISOCRÁTICOS DE CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA

Os métodos analíticos apresentados nesta farmacopeia foram validados e, na maioria das aplicações, mostram-se plenamente aceitáveis em termos de especificidade, exatidão, precisão, linearidade, faixa, robustez

e, quando corresponder, limite de detecção e de quantificação.

No entanto, as técnicas devem ser verificadas em seu estado de validação, considerando as formulações objeto de análise, pois podem existir circunstâncias em que se torne necessária a realização de alterações, visando adequá-las às necessidades específicas. São apresentados na **Tabela 1** os limites aceitáveis para variações em alguns parâmetros cromatográficos.

Em nenhum caso é permitido modificação no comprimento de onda do detector, mudanças na composição qualitativa da fase móvel, aumento no tamanho da partícula nem do volume de injeção.

Tabela 1 – Limites aceitáveis de variação de alguns parâmetros cromatográficos.

Parâmetro	Limites Aceitáveis
Comprimento da coluna	± 70%
Diâmetro da coluna	± 25%
Tamanho da partícula	Pode ser reduzida em até 50%
Fluxo	± 50%
Temperatura	± 10 °C; sem exceder 60 °C
pH	± 0,2 unidades
Concentração de sal em um tampão	± 10%
Composição da fase móvel	±30% relativo ou ±2% absoluto, de componente minoritário (o que for maior). Em nenhum caso poderá superar os 10% absoluto.
Volume de injeção	Redução é aceitável, sempre e quando forem verificados o limite de quantificação e a precisão do sistema cromatográfico.



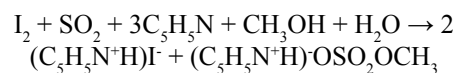
5.2.20 DETERMINAÇÃO DE ÁGUA

Muitas substâncias se encontram na forma de hidrato ou contêm água adsorvida, por isso é relevante sua determinação por métodos específicos.

Em função da natureza da substância, na monografia individual será especificado algum dos métodos que estão descritos a seguir.

1. MÉTODO VOLUMÉTRICO (MÉTODO DE KARL FISCHER)

A determinação volumétrica de água está baseada na reação quantitativa da água com uma solução anidra de dióxido de enxofre e iodo na presença de uma solução tamponante, que reage com os íons hidrogênio, segundo a seguinte reação:



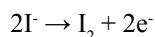
Na solução volumétrica original, conhecida como Reagente de Karl Fischer, o dióxido de enxofre e o iodo são dissolvidos geralmente em piridina e metanol, podendo ser utilizados outros solventes e/ou bases, em cujo caso é necessário verificar a estequiometria e a ausência de interferências. Para este propósito podem ser utilizados reagentes comerciais, considerando-se as recomendações do fabricante.

Existem dois métodos diferentes baseados na reação com o iodo: um é a titulação volumétrica e o outro é um método de titulação coulombimétrica.

No primeiro, o iodo é dissolvido no reagente e o conteúdo de água é determinado medindo a quantidade de iodo consumido como resultado da reação com a água. A amostra em ensaio pode ser titulada diretamente com o reagente ou a análise pode ser realizada por meio de um procedimento de titulação indireta. A estequiometria da reação não é exata e a reprodutibilidade da determinação depende de fatores tais como as concentrações relativas dos componentes do reagente, a natureza do solvente inerte utilizado para dissolver a amostra em ensaio e a técnica utilizada na determinação. Portanto, é necessário padronizar previamente a técnica a fim de se conseguir uma exatidão adequada. A precisão do método depende

da eficácia da eliminação da umidade atmosférica do sistema.

Na titulação coulombimétrica, o iodo é produzido pela eletrólise de um reagente de Karl Fischer que contém o íon iodeto. O conteúdo de água numa amostra pode ser determinado medindo a quantidade de eletricidade necessária para a produção de iodo durante a titulação.



a. Método volumétrico direto

Aparato - Sabendo que o reagente de Karl Fischer é altamente higroscópico, o aparato deve garantir uma exclusão da umidade atmosférica. A determinação do ponto final deve ser adequada. No caso do doseamento direto de uma solução incolor, o ponto final pode ser observado visualmente com uma mudança de cor amarelo intenso para âmbar. O caso inverso se observa quando se realiza um doseamento por retorno (indireto) de uma amostra em ensaio. No entanto, de forma mais habitual, o ponto final é determinado de forma eletrométrica utilizando-se um aparato com um circuito elétrico simples que gera um potencial aplicado de aproximadamente 200 mV entre um par de eletrodos de platina submersos na solução contendo a amostra que se vai dosar. No final do doseamento, um ligeiro excesso do reagente aumenta o fluxo de corrente entre 50 e 150 μA durante um período de 30 segundos a 30 minutos, dependendo da solução que se está dosando. Este período é menor para substâncias que se dissolvem no reagente. Em alguns tituladores volumétricos automáticos, a mudança abrupta de corrente ou de potencial no ponto final faz com que uma válvula seja fechada por solenoide que controla a bureta que fornece a solução volumétrica. Os aparatos disponíveis comercialmente compreendem geralmente um sistema fechado, que consta de uma ou duas buretas automáticas e um vaso de doseamento fechado hermeticamente, equipado com os eletrodos necessários e um agitador magnético. O ar no sistema é mantido seco com um dessecante adequado, por exemplo, cloreto de cálcio anidro ou gel de sílica, e o frasco de titulação pode ser purgado por meio de uma corrente de nitrogênio seco ou de ar seco.

Reagente - O reagente de Karl Fisher pode ser preparado por qualquer dos métodos indicados a seguir.

Nota: o clorofórmio e o metanol utilizados para a preparação do reagente devem ter um conteúdo de água inferior a 0,1 mg/mL. O metoxietanol e o éter monometílico de dietilenoglicol devem ter um conteúdo de água inferior a 0,3 mg/mL.

Método a - Adicionar 125 g de iodo a uma solução que contenha 670 mL de metanol e 170 mL de piridina, e

resfriar. Colocar 100 mL de piridina em uma proveta graduada de 250 mL e, mantendo a piridina fria em banho de gelo, introduzir dióxido de enxofre seco até alcançar o volume de 200 mL. Adicionar lentamente esta solução à mistura de iodo resfriada, agitando até dissolver o iodo. Transferir a solução ao aparato e deixar a solução em repouso durante 24 horas antes de padronizar. Um mL desta solução recentemente preparada equivale a aproximadamente 5 mg de água. Proteger a solução da luz enquanto estiver sendo utilizada. Para determinar água em quantidades traços (menos de 1%), é preferível utilizar um reagente com um fator de equivalência de água não maior que 2,0, o qual irá gerar o consumo de um volume mais significativo da solução volumétrica.

Método b - Dissolver 63 g de iodo em 100 mL de piridina, com um conteúdo de água inferior a 1 mg por mL, resfriar a solução em banho de gelo e passar dióxido de enxofre seco através desta solução até que o aumento de peso seja de 32 g. Completar o volume até 500 mL com clorofórmio ou metanol e deixar em repouso pelo menos durante 24 horas antes de usar.

Método c - Dissolver 102 g de imidazol, com um conteúdo de água inferior a 0,1%, em 350 mL de metoxietanol ou éter monometílico de dietilenoglicol, resfriar a solução em banho de gelo e passar dióxido de enxofre seco através desta solução até que o aumento de peso seja de 64 g, mantendo a temperatura entre 25 e 30 °C. Dissolver 50 g de iodo nesta solução e deixar em repouso pelo menos durante 24 horas antes de usar.

Método d - Passar dióxido de enxofre através de 150 mL de metoxietanol até que o aumento de peso seja de 32 g. A esta solução, previamente resfriada em banho de gelo, adicionar 250 mL de metoxietanol ou clorofórmio que contenha 81 g de 2-metilaminopiridina, com um conteúdo de água inferior a 1 mg por mL. Dissolver 36 g de iodo nesta solução e deixar em repouso pelo menos durante 24 horas antes de usar.

O reagente de Karl Fischer preparado por qualquer destes métodos deve ser padronizado dentro de um período de uma hora antes do seu uso ou diariamente se seu uso é contínuo, pois sua atividade para a determinação de água varia com o tempo. Armazenar o reagente refrigerado, protegido da luz e da umidade.

Pode-se utilizar uma solução estabilizada do reagente de Karl Fisher disponível comercialmente. Também podem ser utilizados reagentes disponíveis comercialmente que contenham solventes ou bases diferentes da piridina ou álcoois diferentes do metanol. Estes podem ser soluções individuais ou reagentes formados *in situ* combinando os componentes dos reagentes presentes em duas soluções diferentes. O reagente diluído necessário em algumas monografias deve ser diluído de acordo com as instruções do fabricante. Como diluente pode ser utilizado metanol ou outro solvente adequado, como o éter monometílico de dietilenoglicol.

Padronização - Colocar uma quantidade suficiente de metanol ou de outro solvente adequado no frasco de titulação para cobrir os eletrodos e adicionar quantidade

suficiente do *Reagente* até obter a cor característica do ponto final, ou $100 \pm 50 \mu\text{A}$ de corrente contínua com um potencial aplicado de aproximadamente 200 mV.

Pode-se utilizar água purificada, tartarato de sódio diidratado, um padrão de referência farmacopeico, ou um padrão comercial com um certificado de análise rastreável até um padrão farmacopeico para padronizar o *Reagente*. O fator de equivalência do reagente, o volume de doseamento recomendado, o tamanho da bureta e a quantidade de padrão a ser pesado são fatores que devem ser considerados no momento de escolher o padrão e a quantidade que vai ser utilizada. Para água purificada ou padrões de água, adicionar rapidamente entre 2 e 250 mg de água, pesados com exatidão, e dosar até o ponto final. Calcular o fator de equivalência da água, F, em mg de água por mL de reagente, pela fórmula:

$$F = P/V$$

em que P é o peso, em mg, da água contida na alíquota do padrão utilizado; e V é o volume, em mL, do *Reagente* utilizado no doseamento. Para tartarato de sódio diidratado ($\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), adicionar rapidamente entre 20 e 125 mg, pesados com exatidão, e dosar até o ponto final. O fator de equivalência de água, F, em mg de água por mL de reagente, é calculado pela fórmula:

$$F = (36,04/230,08) P/V$$

em que 36,04 é o dobro do peso molecular da água e 230,08 é o peso molecular do tartarato de sódio diidratado; P é o peso, em mg, do tartarato de sódio diidratado; e V é o volume, em mL, do *Reagente* consumido no doseamento.

Nota: a solubilidade do tartarato de sódio diidratado em metanol é tal que pode ser necessário o uso de metanol adicional para doseamentos posteriores do padrão.

Preparação da amostra - A não ser que se especifique de outro modo na monografia individual, utilizar uma quantidade pesada ou medida com exatidão da amostra em análise com um conteúdo de água estimado entre 2 e 250 mg. A quantidade de água depende do fator de equivalência de água do *Reagente* e do método de determinação do ponto final. Na maioria dos casos, pode-se estimar a quantidade mínima da amostra (P_m), em mg, por meio da fórmula:

$$P_m = FCV/Kf$$

em que F é o fator de equivalência de água do *Reagente*, em mg/mL; C é o volume utilizado, em percentagem da capacidade da bureta; V é o volume da bureta, em mL; e Kf é o limite ou conteúdo esperado de água na amostra, em percentagem. C está geralmente entre 30% e 100% para o doseamento manual e entre 10% e 100% para o método instrumental de determinação do ponto final.

Nota: é recomendado que o produto FCV seja maior ou igual a 200 para o cálculo, a fim de garantir que a quantidade mínima dosada seja maior ou igual a 2 mg.

Se a amostra em análise é um aerossol com propelente, conservá-la em congelador durante não menos que 2 horas, abrir o envase e analisar 10,0 mL da amostra bem misturada. Para dosar a amostra, determinar o ponto final a uma temperatura de 10 °C ou mais.

Se a amostra em análise são cápsulas, utilizar uma porção do conteúdo homogeneizado de não menos que quatro **cápsulas**. **Se for necessário, triturar o conteúdo até pó fino.**

Se a amostra em análise são comprimidos, utilizar o pó de não menos que quatro comprimidos triturados até pó fino em atmosfera com valores de temperatura e umidade relativa que não afetem os resultados.

Nos casos em que a monografia especifique que a amostra em análise é higroscópica, colocar uma porção do sólido pesada com exatidão em um copo de doseamento, procedendo imediatamente de forma a evitar a absorção de umidade atmosférica.

Se a amostra está constituída por uma quantidade definida de sólido como produto liofilizado ou pó dentro de um frasco, utilizar uma seringa seca para injetar um volume adequado de metanol ou outro solvente apropriado, medido com exatidão, em um recipiente tarado e agitar até dissolver a amostra. Com a mesma seringa, retirar a solução do recipiente, transferir para um frasco de titulação preparado segundo descrito em *Procedimento* e dosar imediatamente. Determinar o consumo de reagente empregado no doseamento do volume de solvente utilizado para o preparo da amostra e subtrair esse valor daquele obtido no doseamento da amostra em análise. Secar o recipiente e sua tampa a 100 °C durante 3 horas, deixar que esfriem em um dessecador e pesar. Determinar o peso da amostra analisada a partir da diferença em peso em relação ao peso inicial do recipiente.

Quando for apropriado, a água pode ser dessorvida ou liberada da amostra por meio de calor em um forno externo conectado ao copo, ao qual se transfere com ajuda de um gás inerte e seco como nitrogênio puro. Tomar cuidado e corrigir qualquer desvio devido ao gás transportador. Selecionar com cuidado as condições de aquecimento para evitar a formação de água como

resultado da desidratação devido à decomposição dos componentes da amostra, o que pode invalidar o método.

Procedimento - A não ser que se especifique de outro modo na monografia individual, transferir quantidade suficiente de metanol ao copo de doseamento, assegurando-se de que o volume seja suficiente para cobrir os eletrodos (aproximadamente 30 a 40 mL), e dosar com o reagente até o ponto final eletrométrico ou visual para consumir a umidade que possa estar presente (não considerar o volume consumido no cálculo). Adicionar rapidamente a amostra preparada como indicado em *Preparação da amostra*, misturar e titular com o *Reagente* até o ponto final eletrométrico ou visual. Calcular o conteúdo de água da amostra, em porcentagem, utilizando a fórmula:

$$\%_{\text{água}} = (VF \times 100)/m$$

em que V é o volume, em mL, do *Reagente* consumido na titulação; F é o fator de equivalência de água do *Reagente* e m é a massa da amostra, em mg.

b. Método por retorno (indireto)

Princípio – Neste doseamento adiciona-se um excesso de *Reagente* à amostra, se espera um tempo suficiente para que se complete a reação e titula-se o *Reagente não consumido com uma solução padrão de água em um solvente como o metanol. O procedimento de doseamento por retorno é aplicado de forma geral e evita os problemas que podem surgir no doseamento direto de substâncias nas quais a água unida é liberada lentamente.*

Aparato, Reagente e Preparação da amostra - Usar o Método volumétrico direto.

Preparação e Padronização da Solução de Água – Preparar uma Solução de Água diluindo 2 mL de água com metanol ou outro solvente adequado até 1000 mL. Padronizar esta solução titulando 25,0 mL com o *Reagente*, previamente padronizado como está descrito em *Padronização do Reagente*. Calcular o conteúdo de água ($C_{\text{água}}$), em mg por mL, da Solução de Água, pela fórmula:

$$C_{\text{água}} = VF/25$$

em que V é o volume do *Reagente* consumido, em mL, e F é o fator de equivalência de água do *Reagente*, em mg/mL.

Procedimento – Transferir quantidade de metanol ou outro solvente adequado ao copo de doseamento, assegurando-se de que o volume seja suficiente para

cobrir os eletrodos (aproximadamente 30 a 40 mL) e dosar com o *Reagente* até o ponto final eletrométrico ou visual. Adicionar rapidamente a amostra, misturar e adicionar um excesso, medido com exatidão, do *Reagente*. Esperar um tempo suficiente para que se complete a reação e dosar o *Reagente não consumido com a Solução Padrão de Água* até o ponto final eletrométrico ou visual. Calcular o conteúdo de água ($\%_{\text{água}}$) da amostra, em porcentagem, pela fórmula:

$$\%_{\text{água}} = F(X' - XR)100/m$$

em que F é o fator de equivalência de água do *Reagente*, em mg/mL; X' é o volume, em mL, do *Reagente* adicionado depois da introdução da amostra; X é o volume, em mL, da *Solução de Água* padronizada necessária para neutralizar o *Reagente não consumido*; R é o quociente, V/25 (mL de *Reagente* por mL de *Solução de Água*), determinado a partir da *Padronização da Solução de Água* para doseamentos volumétricos por retorno (indireto), e m é a massa da amostra, em mg.

c. Método coulombimétrico

Princípio – Para a determinação coulombimétrica da água utiliza-se a reação de Karl Fischer. O iodo, no entanto, não é adicionado na forma de uma solução volumétrica, mas é obtido por oxidação anódica em uma solução que contém iodeto. A célula de reação consta normalmente de um amplo compartimento anódico e de um pequeno compartimento catódico, separados entre si por um diafragma. Também podem ser utilizados outros tipos adequados de células de reação (por exemplo, sem diafragma). Cada compartimento tem um eletrodo de platina que conduz a corrente através da célula. O iodo, que é produzido no eletrodo anódico, reage imediatamente com a água que está presente no compartimento. Quando toda a água for consumida, é produzido um excesso de iodo que normalmente é detectado eletrometricamente, o que indica o ponto final. A umidade é eliminada do sistema por meio da pré-eletrólise. Não é necessário trocar a solução do copo depois de cada determinação. Um requisito deste método é que cada componente da amostra seja compatível com os demais componentes e que não sejam produzidas reações secundárias. Normalmente as amostras são transferidas ao copo na forma de solução mediante a injeção através de um septo. Os gases podem ser introduzidos na célula utilizando um tubo de entrada de gás adequado. A precisão do método depende fundamentalmente do grau de eliminação da umidade atmosférica no sistema; portanto, a introdução de sólidos na célula pode exigir precauções tais como trabalhar em uma atmosfera de gás inerte seco. O controle do sistema pode ser realizado medindo a derivada da linha de base, o que não exclui a necessidade de uma correção com um branco quando se utiliza veículo de introdução da amostra. Este método é especialmente adequado para

substâncias químicas inertes como hidrocarbonetos, álcoois e éteres. Em comparação com o doseamento volumétrico de Karl Fischer, a coulombimétrica é um micrométodo.

Quando for apropriado, a água pode ser dessorvida ou liberada da amostra por meio de calor em um forno externo conectado ao copo, ao qual se transfere com ajuda de um gás inerte e seco como nitrogênio puro. Tomar cuidado e corrigir qualquer desvio devido ao gás transportador. Selecionar as condições de aquecimento para evitar a formação de água como resultado da desidratação devido à decomposição dos componentes da amostra, o que pode invalidar o método.

Aparato – Admite-se o emprego de qualquer equipamento disponível comercialmente que possua um sistema absolutamente hermético, equipado com os eletrodos necessários e um agitador magnético. O microprocessador do equipamento controla o procedimento analítico e mostra os resultados.

Reagente – As soluções eletrolíticas podem ser preparadas por algum dos métodos indicados a seguir, e também podem ser empregados reagentes comerciais.

Nota: *o clorofórmio e o metanol empregados para a preparação do reagente devem ter um conteúdo em água inferior a 0,1 mg/mL. O metoxietanol e o éter monometílico de dietilenoglicol devem ter um conteúdo de água inferior a 0,3 mg/mL.*

Método a - SOLUÇÃO DO ANÓLITO: Dissolver 102 g de imidazol em 900 mL de metanol, resfriar a solução em um banho de gelo e passar dióxido de enxofre seco através da solução mantida em temperatura inferior a 30 °C, até que o aumento de peso seja de 64 g. Dissolver com agitação 12 g de iodo, adicionar uma quantidade apropriada de água à solução até que a cor do líquido passe de marrom a amarelo, e diluir até 1 litro com metanol. SOLUÇÃO DO CATÓLITO: Dissolver 24 g de cloridrato de dietanolamina em 100 mL de metanol.

Método b – SOLUÇÃO DO ANÓLITO: Dissolver 40 g de 1,3-di(4-piridil)propano e 30 g de dietanolamina em aproximadamente 200 mL de metanol e passar dióxido de enxofre seco através da solução até que o aumento de peso seja de 25 g. Adicionar 50 mL de carbonato de propileno e dissolver 6 g de iodo na solução. Adicionar metanol para completar o volume para 500 mL e adicionar uma quantidade apropriada de água até que a cor do líquido passe de marrom a amarelo. SOLUÇÃO DO CATÓLITO: Dissolver 30 g de cloridrato de colina em metanol e diluir para 100 mL com o mesmo solvente.

Método c - SOLUÇÃO DO ANÓLITO: Dissolver 100 g de dietanolamina em 900 mL de metanol ou em uma mistura de metanol e clorofórmio (3:1) e passar dióxido de enxofre através da solução até que o aumento de peso da solução seja de 64 g. Dissolver 20 g de iodo na solução

e adicionar uma quantidade apropriada de água até que a cor do líquido passe de marrom a amarelo. SOLUÇÃO DO CATÓLITO: Dissolver 25 g de cloreto de lítio em 1 litro de uma mistura de metanol e nitrometano (4:1).

Preparação da amostra – Quando a amostra é um sólido solúvel, pode-se dissolver uma quantidade apropriada, pesada com exatidão, em metanol anidro ou outros solventes adequados. Quando a amostra é um sólido insolúvel, pode-se extrair uma quantidade apropriada, pesada com exatidão, usando um solvente anidro adequado e pode-se injetar na solução do anólito. Alternativamente, pode-se utilizar uma técnica de evaporação em que a água seja liberada e evapore por aquecimento da amostra num tubo em uma corrente de gás inerte seco. O gás passa logo para o interior da célula.

Quando a amostra vier a ser utilizada diretamente sem ser dissolvida em um solvente anidro adequado, pode-se introduzir uma quantidade apropriada, pesada com exatidão, diretamente no compartimento anódico.

Quando a amostra é um líquido miscível com metanol anidro ou outros solventes adequados, pode-se adicionar uma quantidade apropriada, pesada com exatidão, ao metanol anidro ou outros solventes adequados.

Procedimento – Utilizando um dispositivo seco, injetar ou adicionar diretamente no anólito uma quantidade, medida com exatidão, da amostra ou da preparação da amostra que contenha entre 0,5 e 5 mg de água, ou quantidade recomendada pelo fabricante do instrumento, misturar e realizar o doseamento coulombimétrico até o ponto final eletrométrico. Ler o conteúdo de água da preparação da amostra diretamente na tela do instrumento e calcular a porcentagem presente na substância. Realizar uma determinação com um branco, conforme seja necessário, e realizar as correções correspondentes.

2. MÉTODO AZEOTRÓPICO - DESTILAÇÃO COM TOLUENO

Princípio – Este método está baseado na destilação, por arraste com vapor de tolueno, da água contida na amostra de um produto sob as condições estabelecidas.

Aparato – Utilizar um balão de vidro com fundo redondo de 500 mL, A, conectando mediante uma conexão, B, a um condensador de refluxo, C, utilizando juntas de vidro esmerilhado (ver **Figura 1**).

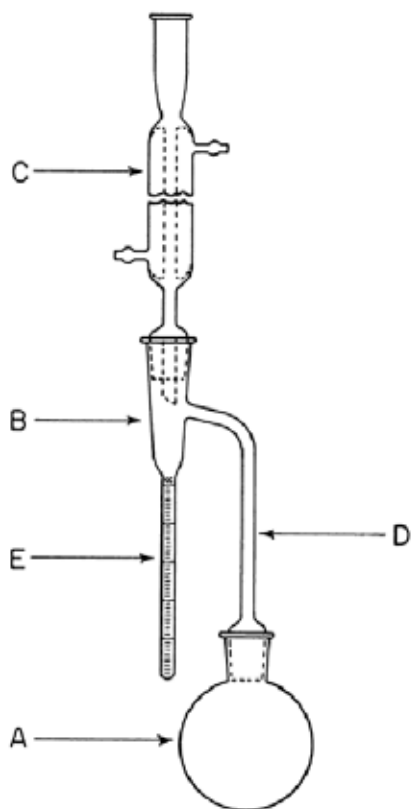


Figura 1 - Aparato para a determinação de água por destilação azeotrópica.

As dimensões críticas das peças do aparato são as seguintes: o tubo de conexão, D, tem um diâmetro interno de 9 a 11 mm. O coletor de destilado tem um comprimento de 235 a 240 mm. O condensador deve ser do tipo de tubo reto, com um comprimento aproximado de 400 mm e um diâmetro interno de não menos que 8 mm. O tubo receptor, E, tem capacidade de 5 mL e sua parte cilíndrica, com um comprimento de 146 a 156 mm, está graduada em subdivisões de 0,1 mL, de forma que o erro de leitura não seja maior que 0,05 mL para qualquer volume indicado. A fonte de calor é preferivelmente um aquecedor elétrico com controle termostático ou um banho de óleo. A parte superior do balão e o tubo de conexão podem estar isolados.

Limpar o tubo receptor e o condensador com uma solução de limpeza adequada, enxaguar exaustivamente com água e secar. Preparar o tolueno que será utilizado agitando-o com pequena quantidade de água, e destilar até separar o excesso de água.

Procedimento – Colocar em um balão seco uma quantidade da substância, pesada com exatidão para obter de 2 a 4 mL de água. Se a substância é do tipo semissólido, pesar sobre uma lâmina metálica ovalada com um tamanho que passe através do gargalo do frasco. Se existe a possibilidade de que ao introduzir a substância sejam produzidas projeções, adicionar quantidade de material poroso (por exemplo: areia lavada e seca, tubos capilares, porcelana). Colocar aproximadamente 200 mL de tolueno no balão, conectar o aparato e encher o tubo receptor, E, com tolueno vertido através da abertura

superior do condensador. Aquecer o balão suavemente durante 15 minutos e, logo que o tolueno entrar em ebulição, destilar a uma velocidade de aproximadamente duas gotas por segundo até que a maior parte da água tenha sido arrastada, depois aumentar a velocidade de destilação para aproximadamente quatro gotas por segundo. Quando aparentemente se tenha destilado toda a água, enxaguar o interior do tubo do condensador com tolueno. Continuar a destilação por mais cinco minutos; remover a fonte de calor e deixar que o tubo receptor esfrie até a temperatura ambiente e arrastar a água aderida às paredes. Após finalizada a separação da água e do tolueno, ler o volume de água e calcular a porcentagem desta que estava presente na substância.

3. MÉTODO GRAVIMÉTRICO

Procedimento para Substâncias Químicas – Proceder como está indicado na monografia individual preparando a substância química como está determinado em *Perda por dessecação* (5.2.9).

Procedimento para Drogas Vegetais – Proceder como está indicado em *Métodos de farmacognosia* (5.4), como indicado na monografia individual.

5.5.3.6 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS ALTERNATIVOS

1 INTRODUÇÃO

A utilização dos métodos microbiológicos é muito importante no controle de qualidade de produtos e insumos farmacêuticos, tendo em vista que a contaminação microbiana pode acarretar alterações em suas propriedades físicas e químicas e afetar a qualidade do produto e a segurança do consumidor.

Os métodos microbiológicos tradicionais, apesar de serem eficientes, simples e de baixo custo, apresentam algumas limitações como resultado tardio, baixa seletividade do meio de cultura e variabilidade da resposta biológica dos micro-organismos.

Na tentativa de contornar as deficiências apresentadas nos métodos tradicionais, têm sido desenvolvidos métodos microbiológicos alternativos. Esses métodos podem proporcionar melhoria na qualidade dos testes, maior sensibilidade e resultados mais rápidos, possibilitando que ações corretivas sejam tomadas precocemente.

Há grandes vantagens com a aplicação desses métodos, mas é necessário um entendimento adequado do seu potencial de aplicação e uma prévia e criteriosa validação devidamente documentada.

Nos métodos alternativos há princípios e conhecimentos específicos exigindo capacitação adequada dos profissionais que os aplicarão. Na escolha do método

deve-se considerar sua aplicabilidade e a compatibilidade com o produto a ser analisado.

Com esse capítulo tem-se o propósito de apresentar os principais métodos microbiológicos alternativos, suas aplicações e critérios gerais para a validação. Não é intenção recomendar o método a ser utilizado e nem apresentar uma lista exaustiva, mas auxiliar no processo de escolha e de validação.

2 TIPOS DE TESTES

Os testes microbiológicos alternativos podem ser divididos em quantitativos, qualitativos e de identificação. Os testes quantitativos são aqueles utilizados quando se tem como objetivo determinar a quantidade de micro-organismos em uma amostra. Com os testes qualitativos evidencia-se a presença ou ausência de micro-organismos. Os testes de identificação, por sua vez, são utilizados com objetivo de caracterizar o micro-organismo presente.

3 PRINCIPAIS MÉTODOS

3.1 Métodos baseados no crescimento

3.1.1 Aspectos Gerais

Os métodos microbiológicos alternativos baseados em tecnologias de crescimento diferem dos métodos convencionais uma vez que utilizam de parâmetros bioquímicos ou fisiológicos ou artefatos decorrentes deles para detecção do crescimento microbiano. Uma das vantagens desses métodos em comparação com os métodos tradicionais reside na capacidade de se processar simultaneamente um grande número de amostras e obter resultados em menor tempo.

Exemplos de métodos microbiológicos alternativos baseados em tecnologias de crescimento:

3.1.2 Métodos Eletroquímicos

Os micro-organismos que se multiplicam em meio de cultura específico produzem metabólitos iônicos altamente carregados, a partir de nutrientes orgânicos fracamente carregados, levando à modificação das propriedades elétricas desses meios. Essas mudanças na impedância (medida por condutância ou capacitância) são monitoradas com eletrodos em contato com o meio de cultura. O ponto final mensurável é o tempo necessário para detectar uma mudança na impedância inicial, sendo inversamente proporcional ao tamanho do inóculo. Para bolores e leveduras, que produzem apenas pequenas mudanças na impedância elétrica, é comum uma medida

indireta de condutância, utilizando um reservatório de hidróxido de potássio. A medida direta da capacitância também pode ser realizada. A detecção automatizada com geração de dados eletrônicos e mapeamento da variação da impedância reflete a curva de crescimento dos micro-organismos, possibilitando reduzir a duração do teste para 48 horas.

3.1.3 Bioluminescência

A Adenosina trifosfato (ATP) está presente em todas as células vivas e sua detecção é um indicador da presença de micro-organismos viáveis. O ensaio consiste em extrair ATP das células microbianas, seguido pelo ensaio quantitativo ou qualitativo utilizando-se o sistema enzimático luciferina/luciferase e medir a luz gerada por um luminômetro, ou uma câmera com dispositivo de carga acoplado. A Luz Relativa (medida em unidade relativa de luz - URL) é diretamente proporcional à quantidade de ATP presente na amostra e depende de fatores como a sensibilidade dos reagentes e o número de micro-organismos presentes. No caso de reduzido número de micro-organismos na amostra, isso é, menos que 10^2 - 10^3 , pode haver necessidade de uma etapa de pré-incubação do sistema. Pode ser necessário ainda aprimorar as etapas de preparação da amostra para reduzir a presença de ATP não microbiano, empregando-se, por exemplo, um pré-tratamento da amostra com as enzimas apirase ou somase. A extração ideal do ATP deve ser rápida e ativa, a fim de evitar sua degradação, garantindo assim parâmetros eficientes de sensibilidade e reprodutibilidade. Como a reação que gera bioluminescência é de natureza enzimática, está sujeita a interferências de produtos que possam inibir ou diminuir a atividade enzimática, devendo ser investigada durante a validação do processo.

3.1.4 Detecção da produção ou consumo de gás

A multiplicação e o metabolismo de micro-organismos em meios de cultura específicos produzem metabólitos ou eliminam nutrientes específicos. Nesse sentido, alterações nas composições gasosas, como produção de CO_2 ou consumo de O_2 podem ser monitoradas e detectadas por meio de detecção colorimétrica, fluorimétrica, transdutores de pressão ou outros tipos de detecção. Esses sistemas são referidos como de detecção microbiana não invasivos e podem acomodar um grande número de amostras.

3.1.5 Emprego de substratos cromogênicos

Substratos cromogênicos são frequentemente utilizados para detectar a presença de enzimas específicas na identificação de micro-organismos empregando métodos manuais ou automatizados. Meios de cultura líquidos ou

sólidos contendo substratos cromogênicos são utilizados para revelar atividades enzimáticas específicas para a detecção e diferenciação de micro-organismos. Nesses meios particulares, substratos definidos são introduzidos na formulação e são hidrolisados pela enzima celular específica de uma determinada bactéria ou fungo durante o crescimento. Esses substratos são escolhidos de acordo com a atividade enzimática e estão relacionados com a presença de indicadores coloridos. Esses produtos possibilitam melhor diferenciação das colônias em culturas mistas, sendo de fácil uso e interpretação. Além disso, o tempo de resposta é menor, porque o crescimento e a identificação do micro-organismo são simultâneos. No entanto, a validação dos meios de cultura deve ser realizada cuidadosamente para garantir uma combinação de seletividade, especificidade e robustez. A qualidade do sinal é baseada não só na escolha criteriosa das enzimas a serem avaliadas, pois podem estar presentes em diferentes gêneros, mas também nas características físico-químicas do meio, tal como o pH.

3.2 Métodos baseados na medida direta da viabilidade

3.2.1 Aspectos gerais

Métodos baseados na medida direta da viabilidade são rápidos e independentes da proliferação microbiana. Baseiam-se no uso de corantes para componentes bioquímicos de células microbianas ou fluorescência obtida pela clivagem enzimática de substratos fluorogênicos em micro-organismos com paredes celulares funcionais.

3.2.2 Citometria de fase sólida

Na citometria de fase sólida usa-se um indicador de viabilidade fluoróforo, que é retido no citoplasma de micro-organismos com membrana íntegra. O substrato conjugado não fluorescente requer atividade enzimática intracelular para ser clivado e liberar a porção fluorescente. Um leitor automático a *laser* possibilita a leitura das células fluorescentes e *softwares* apropriados possibilitam a diferenciação entre células viáveis e partículas fluorescentes. A diferenciação entre células viáveis e não viáveis é baseada na presença ou ausência de atividade da esterase e na membrana celular intacta. Nessa técnica se utiliza a filtração em membrana para separar os possíveis contaminantes microbianos de amostras filtráveis e subsequente marcação das células retidas com o substrato de viabilidade. Esse é hidrolisado por enzimas esterases não específicas no citoplasma dos micro-organismos metabolicamente ativos, liberando o fluoróforo livre. Antes da marcação, um contracorante pode ser adicionado para minimizar a fluorescência de fundo, assim como pode ser necessária uma etapa de pré-incubação para a ativação de esporos ou a recuperação

de micro-organismos estressados ou fastidiosos. A membrana filtrante é varrida por um sistema *laser* do citômetro e a luz fluorescente é detectada por células fotomultiplicadoras.

3.2.3 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo possibilita detectar micro-organismos suspensos em um meio líquido. Os mecanismos de marcação e detecção são similares à citometria de fase sólida, porém a amostra não precisa ser filtrada. Os micro-organismos marcados pelo indicador de viabilidade não fluorescente podem ser detectados em suspensão, ao passar por um citômetro de fluxo. A amostra marcada é injetada em uma célula de fluxo de quartzo e passa por um feixe de *laser* excitatório para detecção dos micro-organismos. A citometria de fluxo também fornece resultados rápidos, mas é menos sensível que a citometria de fase sólida. Para melhorar o desempenho, pode ser realizada uma etapa prévia de incubação em meio de cultura, o que tornaria o método baseado em crescimento.

3.2.4 Epifluorescência direta

Nesse método, assim como na citometria de fase sólida, as amostras são filtradas e coradas com um indicador de viabilidade fluorescente, como o corante alaranjado de acridina ou o **4',6-diamidino-2-fenilindol** (DAPI). Os micro-organismos são detectados por microscopia epifluorescente. A epifluorescência possibilita a detecção rápida de micro-organismos e sua sensibilidade depende do volume filtrado e do número de campos examinados. Sistemas com análise de imagens aumentam a utilidade do método. A técnica de filtração epifluorescente direta é aplicável a produtos líquidos e fluidos de baixa viscosidade, podendo também ser aplicável a produtos particulados previamente diluídos. Uma modificação desse método emprega amostragem usando uma folha adesiva para a coleta de células de superfície, coloração na folha e subsequente observação direta em microscópio epifluorescente.

3.3 Métodos baseados na análise de componentes celulares

3.3.1 Aspectos gerais

Englobam métodos nos quais a expressão de alguns componentes celulares fornece a medida indireta da presença microbiana. Há alto grau de especificidade e possibilitam resultados rápidos. Pode ser necessário elevado número de células.

3.3.2 Fenotípico

3.3.2.1 Imunológicos

Com os métodos imunológicos detectam-se e quantificam-se micro-organismos por meio da interação antígeno-anticorpo. São úteis na identificação de micro-organismos específicos ou determinantes celulares únicos. A interação antígeno-anticorpo pode estar relacionada a fenômenos de aglutinação ou visualização do ponto final por colorimetria ou fluorimetria. Há grande sensibilidade e especificidade.

O teste ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ensaio de imunoabsorção ligado à enzima) é uma técnica de marcação para indicar presença ou ausência de um anticorpo ou antígeno. Nessa técnica há pelo menos um anticorpo com especificidade para um antígeno em particular. A amostra contendo o antígeno é imobilizada em um suporte sólido (normalmente placa de microtitulação em poliestireno). Após a imobilização do antígeno o anticorpo ligado a uma enzima é adicionado e forma um complexo com o antígeno. Em seguida, é adicionado um substrato enzimático que produz um sinal visível, em geral por mudança de cor, que indica a presença de antígeno na amostra.

Os métodos imunológicos dependem de expressão única de identificadores específicos, portanto, não indicam necessariamente a presença de micro-organismos.

Os imunoenaios são simples, baratos e podem ser usados para análises qualitativa e quantitativa.

3.3.2.2 Perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos celular é único e estável, com alto grau de homogeneidade e reprodutibilidade dentro de um grupo taxonômico. A diferenciação e identificação de grande variedade de micro-organismos podem ser feitas por meio da quantidade e tipos de ácidos graxos extraídos da amostra microbiana. Os ácidos graxos de cadeia ramificada são comuns em muitas bactérias Gram-positivas, enquanto que as bactérias Gram-negativas são compostas predominantemente de ácidos graxos de cadeia linear. O isolado é cultivado em meio de cultura padrão, sendo importante o uso de culturas de 24 ± 2 horas, para garantir que as células estejam em fase de crescimento exponencial. Os ácidos graxos são extraídos por processo de saponificação, seguido de metilação para convertê-los no respectivo éster metílico (FAME – *Fatty Acid Methyl Ester*), que é extraído da fase aquosa pelo uso de solvente orgânico e o extrato resultante é analisado por cromatografia gasosa de alta resolução. O perfil de ésteres metílicos dos ácidos graxos extraídos de uma amostra é comparado com isolados conhecidos, num banco de dados. Essa técnica requer alto grau de padronização, incluindo os meios de cultura, temperatura de incubação e condições de operação.

3.3.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier aplicada à microbiologia teve um impulso considerável nesses últimos anos considerando a rapidez e simplicidade de aplicação da técnica. A região do infravermelho pode compor-se de três zonas (NIR, MIR E FIR) de acordo com o comprimento de onda. Com a técnica estuda-se a interação entre a radiação infravermelha e a matéria.

Quando a matéria absorve radiação na região do infravermelho, ocorrem alterações do nível vibracional das ligações químicas. Os comprimentos de onda em que ocorrem essas transições são característicos de cada grupo funcional. Assim, é possível elaborar tabelas que possibilitam a identificação de moléculas em amostras cuja composição é desconhecida, com a construção de bancos de dados específicos que permitem a identificação dos micro-organismos. O micro-organismo pesquisado deve ser isolado em um meio de cultivo, coletado e analisado em espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier e o espectro obtido deve ser comparado com um banco de dados para a identificação.

3.3.2.4 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa possibilita a determinação e identificação de estruturas químicas por meio de avaliação da massa e da carga iônica. É uma técnica que pode ser utilizada na análise de biomoléculas e grandes moléculas orgânicas, como DNA, proteínas, peptídeos, açúcares e polímeros.

A técnica MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight*) é uma técnica de ionização e dessorção a *laser* assistida por matriz que irradia amostras biológicas cristalizadas associadas a compostos químicos. As moléculas ionizadas e aceleradas são lançadas em um tubo sob vácuo e sem campo elétrico, para medida de seu tempo de voo, proporcional à massa molar da molécula, até o detector. Usa-se a técnica MALDI-TOF para identificação rápida de micro-organismos que são tratados como entidades químicas complexas. A cultura microbiana é colocada no poço de uma placa e coberta com matriz de solvente. A placa é exposta ao *laser*, causando dessorção de componentes celulares ionizados, que percorrem o tubo em direção ao detector de massa. O tempo de detecção difere para cada molécula e a análise completa da célula microbiana fornece um espectro de massa a partir das macromoléculas. O sinal do detector é capturado como uma única impressão digital para cada micro-organismo. O espectro obtido é comparado num banco de dados.

A SELDI-TOF é uma variação da MALDI-TOF onde a amostra de cultura é colocada diretamente em uma superfície quimicamente modificada.

Na técnica de espectrometria de massa os isolados microbianos requerem cultura antes da análise.

3.3.2.5 Ensaio bioquímicos baseados em reações fisiológicas

Os micro-organismos podem ser caracterizados por reações bioquímicas com determinadas substâncias químicas ou pela utilização de fontes específicas de carbono. A identificação do micro-organismo pode ser feita comparando o perfil de reações bioquímicas com um banco de dados. As análises podem ser realizadas manualmente ou empregando equipamentos específicos.

Testes preliminares de diferenciação, como a coloração de Gram, possibilitam decidir pela utilização adequada da série de reações bioquímicas e/ou enzimáticas. Normalmente suspensões microbianas são testadas usando kits de testes bioquímicos. Esses ensaios requerem colônias puras com até 3 dias de cultivo. O sistema é de fácil operação, mas a interpretação dos resultados pode ser subjetiva. O resultado pode ser rápido, dependendo do sistema usado e do micro-organismo investigado.

3.3.3 Genotípico

3.3.3.1 Amplificação de ácidos nucleicos

As técnicas que empregam a amplificação de ácidos nucleicos podem possibilitar a identificação de micro-organismos a partir do aumento exponencial de um fragmento específico do ácido nucleico. Vários métodos podem ser empregados na análise dos fragmentos: tamanho, sequência específica, reamplificação com um segundo par de *primer* ou detecção específica por hibridização com *probe* fluorescente. Na escolha do método deve-se considerar a finalidade da análise. A utilização do DNA como marcador pode detectar os micro-organismos não viáveis que também contêm o DNA, enquanto que o mRNA é degradado rapidamente em micro-organismos não viáveis, sendo considerado um bom marcador para a viabilidade.

3.3.3.2 Impressões digitais

Essa técnica caracteriza e identifica os micro-organismos em nível de subespécie, utilizando fragmentos de restrição dos ácidos nucleicos a partir de genomas bacterianos e fúngicos. A partir de uma cultura pura e lisada, o DNA é extraído e fragmentado por enzimas de restrição. Os fragmentos de DNA são separados pelo seu tamanho por eletroforese, visualizados e comparados com padrões obtidos de espécies conhecidas. A ribotipagem é um exemplo típico dessa técnica. Existem também métodos baseados em impressão digital de PCR com *primers* que se ligam aos vários sítios do genoma microbiano, criando fragmentos amplificados com uma distribuição

de tamanho característico. Para o emprego dessa técnica é necessário o uso de colônias puras.

4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS ALTERNATIVOS

4.1 Aspectos gerais

O objetivo principal pretendido com esse item é fornecer orientações gerais para a validação de métodos microbiológicos alternativos, para demonstrar a não inferioridade entre esse e o tradicional.

Antes da validação formal, deve ser realizada avaliação crítica do método alternativo que se deseja validar. Alguns aspectos devem ser verificados, como a compatibilidade do método alternativo com o produto e sua adequabilidade à rotina. Além disso, é necessário avaliar o processo produtivo para identificar as possíveis fontes de contaminação microbiana e seu perfil microbiológico. Essa avaliação deve levar em consideração, por exemplo, os micro-organismos isolados das matérias-primas; o controle em processo ou no desenvolvimento do processo; o monitoramento ambiental; bem como os micro-organismos de crescimento lento e os micro-organismos contaminantes comuns ao produto, relatados na literatura. Essa avaliação será importante para determinar as amostras mais adequadas e identificar os tipos e número de micro-organismos associados com o processo que devem ser abordados na validação do novo método. Independente do novo método a ser validado, o equipamento, quando utilizado, incluindo o *hardware* e o *software* do computador, deve ser qualificado/validado de acordo com as Boas Práticas. Alguns métodos alternativos dependem do uso de banco de dados. A extensão da cobertura desse banco precisa estar descrita no objetivo pretendido com a validação. Conforme a natureza do ensaio microbiológico os parâmetros de validação seguem a **Tabela 1**.

Tabela 1 - Parâmetros de validação pelo tipo de teste microbiológico.

Parâmetros	Testes quantitativos	Testes qualitativos	Testes de identificação
Especificidade	Sim	Sim	Sim
Limite de detecção	Sim	Sim	Não
Exatidão	Sim	Não	Sim
Precisão	Sim	Não	Sim
Limite de quantificação	Sim	Não	Não
Linearidade	Sim	Não	Não
Intervalo	Sim	Não	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim

Considerando as características intrínsecas dos micro-organismos, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) segue a distribuição de Poisson e nesse caso para os testes quantitativos as técnicas estatísticas de Poisson são adequadas. Se a distribuição normal for utilizada, é frequentemente necessária a prévia transformação de dados brutos por meio da adoção de alguma conversão logarítmica ou raiz quadrada da contagem +1. Essa última exige atenção especial quando há ocorrência de resultado zero. Após a transformação é necessária a aplicação de um teste de avaliação da normalidade dos dados.

O espectro de micro-organismos escolhido para a validação do método alternativo e para a demonstração da não inferioridade em relação ao método tradicional deve ser cuidadosamente justificado. Os micro-organismos descritos no capítulo 5.5, especificamente nos itens 5.5.3.1 (Ensaio microbiológico para produtos não estéreis), **Tabela 1**, ou 5.5.3.2 (Ensaio microbiológico para produtos estéreis), **Tabela 1**, constituem uma referência a ser seguida. Adicionalmente, recomenda utilizar-se os isolados microbianos que sejam recorrentes à amostra testada.

Na validação do método alternativo, a não inferioridade em relação ao método tradicional deve ser comprovada. Com esse atributo tem-se como propósito demonstrar que o método alternativo não é menos sensível e é tão eficaz quanto o método tradicional, considerando uma margem de tolerância fixada previamente, denominada margem de não inferioridade (M).

A não inferioridade de um método alternativo (A) em relação ao método tradicional (T) é estabelecida a partir da construção de intervalos de confiança bilaterais, IC 95%, ou unilaterais, IC 97,5%, nos quais o limite superior para a diferença $T - A$ é menor que a margem (M).

As hipóteses, nula (H_0) e alternativa (H_1), relativas aos estudos de não inferioridade são, respectivamente:

H_0 : $T - A \geq M$ (o método alternativo é inferior ao método tradicional).

H_1 : $T - A < M$ (o método alternativo não é inferior ao método tradicional).

Rejeitar a hipótese nula acima representa que o método alternativo (A) não é inferior ao método tradicional (T).

Na demonstração da não inferioridade, devem submeter-se ao método tradicional os mesmos tipos de produtos e as mesmas suspensões microbianas utilizadas na avaliação do método alternativo. Entretanto, deve-se ter atenção para os testes cujo perfil de contaminação das amostras é zero. Nesses casos, a demonstração de não inferioridade com o uso de amostras contaminadas é mais apropriada. Para os testes qualitativos, a demonstração de não inferioridade deve ser realizada para o parâmetro Limite de Detecção. Para testes quantitativos, a demonstração deve ser feita para Limite de Detecção, Limite de Quantificação, Exatidão e Precisão. No caso dos testes de identificação, a demonstração de não inferioridade deve ser realizada para os parâmetros de Exatidão e Precisão.

4.2 Parâmetros

4.2.1 Especificidade

A especificidade, no contexto dos métodos microbiológicos não seletivos, representa a capacidade do método em promover uma resposta positiva para os diferentes micro-organismos que se espera estejam presentes em uma amostra. Em se tratando de métodos microbiológicos seletivos, a demonstração da especificidade também envolve a obtenção de resultados negativos para os micro-organismos que não são de interesse para o método. Em ambos os casos, quando se tratarem de métodos cuja interpretação do resultado não seja obtida por meio da leitura direta do crescimento microbiano, deve ser também demonstrado que componentes da matriz, contaminantes ou materiais estranhos não são capazes de promover resultados falsos positivos ou falsos negativos. Para esse parâmetro é importante que seja testado o maior número possível de micro-organismos.

4.2.2 Limite de detecção

O limite de detecção é o menor número de micro-organismos em uma amostra que pode ser detectado sob as condições experimentais estabelecidas. Refere-se ao número de micro-organismos presentes na amostra original antes de qualquer diluição ou incubação.

O método alternativo e o método tradicional devem ser avaliados usando um inóculo contendo uma baixa concentração de micro-organismos. A concentração desse inóculo deve ser ajustada ao longo do estudo para que pelo menos 50% dos resultados obtidos pelo método tradicional seja positivo. Um número mínimo de 5 replicatas deve ser utilizado para cada concentração escolhida.

A não inferioridade com o método tradicional deve ser demonstrada por meio da comparação estatística do número de resultados positivos e negativos obtidos entre os dois métodos. O teste de Chi-Quadrado pode ser utilizado para esse propósito. O limite de detecção atingido deve ser compatível com a finalidade proposta para o método, como por exemplo, deve haver significativa confiança para que um método proposto para a análise de esterilidade seja capaz de detectar 1 UFC na amostra a ser testada.

4.2.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação é o menor número de micro-organismos capaz de ser determinado com precisão e exatidão sob as condições experimentais estabelecidas. Esse parâmetro deve ser determinado com, no mínimo, 5 concentrações dentro da faixa de trabalho para cada micro-organismo e em 5 replicatas para cada concentração. Alternativamente os resultados da linearidade e exatidão podem ser utilizados e, nesse caso, o limite de quantificação corresponde à menor concentração encontrada no intervalo.

4.2.4 Exatidão

A exatidão representa a proximidade dos resultados obtidos experimentalmente em relação aos resultados esperados para a diluição microbiana utilizada ou àqueles obtidos pelo método tradicional. Geralmente é expressa como a % de recuperação de micro-organismos. A exatidão pode ser demonstrada empregando suspensão microbiana com concentração no limite superior do intervalo de trabalho definido para o método. A partir dessa suspensão, diluições seriadas devem ser preparadas cobrindo toda a faixa de trabalho, que deve sobrepor-se a do método tradicional. A suspensão original e suas diluições devem compor as diferentes concentrações microbianas. Esse parâmetro deve ser determinado com, no mínimo, 5 concentrações dentro da faixa de trabalho para cada micro-organismo e em 5 replicatas para cada

concentração. A percentagem de recuperação do método alternativo deve situar-se em $100 \pm 30\%$.

Para demonstrar a não inferioridade, nos dois métodos, não é necessário obter graus de recuperação estatisticamente iguais. A verificação de que os resultados obtidos com o método alternativo atendem ao critério de aceitação é suficiente na maioria das vezes. Entretanto, os resultados obtidos com o método alternativo podem ser comparados com os resultados com o método tradicional para determinar qual é mais exato. Para tanto a normalidade dos dados deve ser verificada por meio de algum teste estatístico para esse fim. Uma vez encontrada a normalidade dos dados pode ser realizado o teste F de Snedecor, para verificar a igualdade das variâncias. Caso essas sejam iguais, a comparação das médias de recuperação pode ser realizada pelo teste de T de Student ou Análise de Variância (ANOVA).

4.2.5 Precisão

A precisão é o grau de concordância entre os resultados de testes individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente em suspensões homogêneas de micro-organismos contemplando a faixa de trabalho. Geralmente é expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) dos resultados obtidos. Esse parâmetro pode ser demonstrado empregando suspensão microbiana com concentração definida e a partir dessa, diluições seriadas devem ser preparadas.

A precisão deve ser determinada com, no mínimo, 2 concentrações, sendo uma situada no limite de quantificação e outra no limite da especificação do produto para cada micro-organismo e em 10 replicatas para cada concentração. Para a avaliação da precisão intermediária, o experimento deve ser repetido em outro dia de trabalho.

Para os testes de identificação, a precisão deve ser determinada com 10 replicatas em dias diferentes de trabalho.

Geralmente, valores menores que 30% para o coeficiente de variação demonstram uma precisão aceitável para os métodos. A não inferioridade, entretanto, entre o método alternativo e o tradicional deve ser demonstrada por meio de um teste estatístico apropriado.

4.2.6 Linearidade

A linearidade é a capacidade do método de produzir resultados que são proporcionais à concentração de micro-organismos presentes na amostra dentro de um dado intervalo.

Esse parâmetro deve ser determinado com, no mínimo, 5 concentrações microbianas para cada micro-organismo e em 5 replicatas para cada concentração.

Deve-se atentar para as limitações dos métodos existentes, tanto para o método alternativo quanto para o tradicional, para que as concentrações utilizadas não produzam resultados sobrepostos. Portanto, ajustes no número de concentrações podem ser realizados caso o limite de trabalho seja restrito.

A avaliação da linearidade pode ser realizada por meio do cálculo do quadrado do coeficiente de correlação, r^2 , a partir de uma análise de regressão linear dos dados gerados. Apesar do coeficiente de correlação não fornecer uma estimativa da linearidade, ele é comumente aplicado para dar uma ideia de relação. O método alternativo não deve possuir um valor de r^2 menor do que 0,95.

4.2.7 Intervalo

O intervalo é a faixa entre a menor e a maior concentração de micro-organismos que tenham sido determinadas com precisão, exatidão e linearidade seguindo as

instruções no método. O intervalo é determinado a partir dos estudos de precisão, exatidão e linearidade.

4.2.8 Robustez

A robustez é o grau de reprodutibilidade dos resultados obtidos no teste por análise da mesma amostra com variações das condições normais do teste, tais como: instrumentos, lotes de reagentes e laboratórios. Possibilita estabelecer a viabilidade da técnica face às variações deliberadas nos parâmetros operacionais.

5. PRINCIPAIS APLICAÇÕES

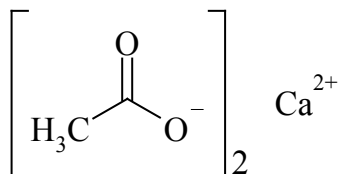
A escolha do método microbiológico alternativo requer o conhecimento sobre a sua base científica e deve considerar a finalidade do teste e a sua compatibilidade com o produto a ser analisado. Na **Tabela 2**, estão relacionadas orientações/sugestões de aplicações dos métodos disponíveis.

Tabela 2 - Principais aplicações dos métodos microbiológicos alternativos.

Métodos	Tecnologia	Aplicações
Crescimento	Eletroquímica	Ensaio microbiológico de antibióticos; teste de eficácia antimicrobiana.
	Detecção do consumo ou produção de gás	Teste de esterilidade.
	Bioluminescência	Contagem microbiana em matérias-primas, água e produtos; monitoramento ambiental; teste de esterilidade; teste de eficácia antimicrobiana.
	Emprego de substratos cromogênicos	Identificação microbiana.
Viabilidade	Citometria de fase sólida	Contagem microbiana em matérias-primas, água e produtos; monitoramento ambiental; teste de esterilidade.
	Citometria de fluxo	Contagem microbiana em matérias-primas, água e produtos.
	Epifluorescência direta	Contagem microbiana em matérias-primas, água e produtos; monitoramento ambiental.
Fenotípico	Imunológicos	Análise de endotoxinas bacterianas; identificação microbiana.
	Perfil de ácidos graxos	Identificação microbiana.
	Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)	Identificação microbiana.
	Espectrometria de massa	Identificação microbiana.
	Ensaio bioquímicos baseados em reações fisiológicas	Identificação microbiana.
Genotípico	Amplificação de ácidos nucleicos	Identificação microbiana.
	Impressões digitais	Identificação microbiana.

ACETATO DE CÁLCIO

Calcii acetat



$C_4H_6CaO_4$; 158,17

acetato de cálcio; 09629

Sal de cálcio do ácido acético (1:2)

[62-54-4]

Contém, no mínimo, 99,0% e, no máximo, 100,5% de $C_4H_6CaO_4$ em relação à substância anidra.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó branco, livre de odor, higroscópico.

Solubilidade. Facilmente solúvel em água, pouco solúvel em etanol.

IDENTIFICAÇÃO

A. Responde às reações do íon cálcio (5.3.1.1).

B. Responde às reações do íon acetato (5.3.1.1).

ENSAIOS DE PUREZA

pH (5.2.19). 7,2 a 8,2. Determinar em solução a 5% (p/v).

Bário. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de emissão atômica (5.2.13.2)*.

Utilizar espectrofotômetro provido de lâmpada de cátodo oco de bário e selecionar a linha de emissão em 455,4 nm.

Solução amostra: dissolver 5,00 g da amostra em água e diluir até 100,0 ml com o mesmo solvente.

Solução padrão: preparar a solução de referência utilizando solução padrão de bário (0,1% Ba) R, diluída com água ultrapurificada.

No máximo: 0,005% (50 ppm).

Estrôncio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*, utilizar o *Método II*.

Utilizar espectrofotômetro provido de chama alimentada com mistura de ar-acetileno, lâmpada de cátodo oco de magnésio e selecionar a linha de emissão em 460,7 nm.

Solução amostra: pesar, exatamente, cerca de 2 g da amostra e transferir para um balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com água e misturar. No máximo 0,05% (500 ppm).

Fluoreto. Utilizar eletrodo seletivo para o íon fluoreto. No máximo 0,005% (50 ppm).

Solução tampão: transferir para um balão volumétrico de 250 mL, 73,5 g de citrato de sódio di-hidratado. Completar o volume com água.

Solução padrão: dissolver em água quantidade, exatamente pesada, de fluoreto de sódio SQR para obtenção de uma solução contendo 1,1052 mg/mL. Transferir 20 mL dessa solução para um balão volumétrico de 100 mL contendo 50 mL da *Solução tampão*. Completar volume com água e misturar. Essa solução contém 100 µg de íon fluoreto por mL. A partir dessa solução, transferir para sucessivos balões volumétricos de 100 mL contendo, cada um, 50 mL da *Solução tampão* e 2 mL de ácido clorídrico, 100 µL, 200 µL, 300 µL e 500 µL da *Solução padrão*. Completar o volume, transferir cada solução para diferentes copos de bquer e proceder às leituras potenciométricas a fim de construir a curva analítica.

Solução amostra: transferir 2 g da amostra para um bquer, adicionar 20 mL de água e 2 mL de ácido clorídrico, manter sob agitação até a completa dissolução da amostra. Adicionar 50 mL da *Solução tampão* e completar com água até 100 mL. Proceder às leituras potenciométricas e calcular a quantidade de fluoreto a partir das leituras obtidas.

Magnésio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*, utilizar o *Método II*.

Utilizar espectrofotômetro provido de chama alimentada com mistura de ar-acetileno, lâmpada de cátodo oco de magnésio e selecionar a linha de emissão em 285,2 nm.

Solução amostra: preparar uma solução com 200 mg de amostra em 100 mL de água. No máximo 0,05% (500 ppm).

Nitrato. Dissolver 1 g da amostra em 10 mL de água e adicionar 5 mg de cloreto de sódio, 0,05 mL de índigo carmim SR e, sob agitação, 10 mL de ácido sulfúrico livre de nitrogênio. Uma coloração azul intensa persiste por, no mínimo, 10 minutos.

Potássio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*, utilizar o *Método II*.

Utilizar espectrofotômetro provido de chama alimentada com mistura de ar-acetileno, lâmpada de cátodo oco de magnésio e selecionar a linha de emissão em 766,7 nm.

Solução amostra: pesar, exatamente, cerca de 1,25 g da amostra e transferir para um balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com água e misturar. No máximo 0,05% (500 ppm).

Sódio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*, utilizar o *Método II*.

Utilizar espectrofotômetro provido de chama alimentada com mistura de ar-acetileno, lâmpada de cátodo oco de magnésio e selecionar a linha de emissão em 589,0 nm.

Solução amostra: pesar, exatamente, cerca de 1 g da amostra e transferir para um balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com água e misturar. No máximo 0,05% (500 ppm).

Alumínio (5.3.2.10). Dissolver 4 g da amostra em 100 mL de água e proceder conforme descrito em *Ensaio limite para alumínio*. No máximo 0,0001% (1 ppm).

Arsênio (5.3.2.5). Utilizar o *Método visual*. Pesar 1 g da amostra e proceder conforme *Ensaio limite para arsênio*. No máximo 0,0002% (2 ppm).

Chumbo (5.3.2.12). No máximo 0,001% (10 ppm).

Cloretos (5.3.2.1). Dissolver 1 g da amostra em 40 mL de água e prosseguir conforme descrito em *Ensaio limite para cloretos*. No máximo 0,0354% (354 ppm).

Metais pesados (5.3.2.3). Utilizar o *Método I*. Dissolver 1 g da amostra em 10 mL de água, adicionar 6 mL de ácido clorídrico 3 M e completar com água para volume de 25 mL. Prosseguir conforme descrito em *Ensaio limite para metais pesados*. No máximo 0,002% (20 ppm).

Sulfatos (5.3.2.2). Dissolver 2 g da amostra em 40 mL de água e prosseguir conforme descrito em *Ensaio limite para sulfatos*. No máximo 0,06% (600 ppm).

Água (5.2.20.1). No máximo 7,0%.

Substâncias facilmente oxidáveis. Dissolver 2 g da amostra em 10 mL de água em ebulição. Adicionar algumas pérolas de vidro, 6 mL de ácido sulfúrico 5 M e 0,3 mL de permanganato de potássio SR. Misturar, aquecer a ebulição durante 5 minutos. Deixar em repouso até que todo precipitado tenha decantado. Uma coloração rosa permanece na solução sobrenadante.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA.

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Dissolver, exatamente, cerca de 300 mg da amostra em 150 mL de água, contendo 2 mL de ácido clorídrico 3 M. Manter sob agitação e adicionar cerca de 30 mL de edetato dissódico 0,05 M SV a partir de uma bureta de 50 mL. Adicionar 15 mL de hidróxido de sódio M e 300 mg de azul de hidroxinaftol. Continuar a titulação até o ponto final, de coloração azul. Cada mL de edetato dissódico 0,05 M SV equivale a 7,909 mg de $C_4H_6CaO_4$.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Adjuvante farmacêutico utilizado em soluções para diálise.

ÁCIDO FOSFÓRICO

Acidum phosphoricum

H_3PO_4 ; 98,00
ácido fosfórico; 00199
Ácido fosfórico
[7664-38-2]

Contém, no mínimo, 85,0% e, no máximo, 88,0%, em peso de H_3PO_4 .

DESCRIÇÃO

Características físicas. Líquido xaroposo, límpido, incolor, corrosivo.

Solubilidade. Miscível em água e em etanol.

IDENTIFICAÇÃO

Quando cuidadosamente neutralizado com hidróxido de sódio M, usando fenolftaleína SI como indicador, responde às reações do íon fosfato (5.3.1.1).

ENSAIOS DE PUREZA

Ácido fosforoso e hipofosforoso. Diluir 6 mL da amostra em 14 mL de água. Aquecer 5 mL da diluição em banho-maria e adicionar 2 mL de nitrato de prata SR. A mistura não deve escurecer ou precipitar.

Fosfatos alcalinos. Transferir 1 mL da amostra para uma proveta e adicionar 6 mL de éter etílico e 2 mL de etanol. Nenhuma turvação é produzida.

Substâncias precipitáveis pela amônia. Dissolver 10 g da amostra e diluir para 100 mL com água. Pipetar 6,7 mL da diluição e completar para 10 mL de água. Adicionar 8 mL de amônia SR. A solução obtida não é mais opalescente que a mistura de 6,7 mL da diluição em 18 mL de água.

Sulfatos. Diluir 6 mL da amostra em 90 mL de água e adicionar 1 mL de cloreto de bário SR. Nenhum precipitado se forma imediatamente.

Arsênio (5.3.2.5). Utilizar 5 mL da solução obtida no ensaio *Substâncias precipitáveis pela amônia*. No máximo 0,0002% (2 ppm).

Cloretos (5.3.2.1). A 10 mL da solução obtida no ensaio *Substâncias precipitáveis pela amônia* acrescentar 5 mL de água. Adicionar 1 mL de nitrato de prata SR. Preparar o padrão da mesma maneira acrescentando 1 mL de ácido nítrico, 1,4 mL de ácido clorídrico 0,01 M SV e 13,6 mL de água. Após 5 minutos ao abrigo da luz, observar os tubos no sentido do eixo longitudinal de cima para baixo e sobre fundo escuro. Se a preparação da amostra apresentar opalescência, não é mais intensa do que a padrão. No máximo 0,005% (50 ppm).

Ferro (5.3.2.4). Utilizar 2 mL da solução obtida no ensaio *Substâncias precipitáveis pela amônia*. Utilizar 1 mL de *Solução padrão de ferro (10 ppm Fe)* como padrão. No máximo 0,005% (50 ppm).

Metais pesados (5.3.2.3). No máximo 0,001% (10 ppm).

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA.

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Pesar, exatamente, cerca de 1 g da amostra em um erlenmeyer e acrescentar 10 g de cloreto de sódio e 30 mL de água. Titular com hidróxido de sódio M SV utilizando fenolftaleína SI como indicador. Efetuar uma prova em branco e fazer as correções necessárias. Cada mL de hidróxido de sódio M SV equivale a 49,000 mg de H₃PO₄.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados e de vidro.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CATEGORIA

Preparação de ácido fosfórico diluído.

ÁGAR-ÁGAR

Agar

ágar-ágar; 09547

Ágar

[9002-18-0]

Substância seca, coloidal, hidrofílica extraída de algas *Gelidium cartilagineum* L. (Gaillon) – GELIDIACEAE, *Gracilaria confervoides* L. (Greville) – SPHAEROCOCCACEAE e algas vermelhas relacionadas (Classe RHODOPHYCEAE).

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA

Apresenta-se em feixes, consistindo de tiras membranosas aglutinadas ou em forma de grânulos ou flocos. Pode apresentar-se com coloração amarelo-alaranjada, cinza-amarelada, levemente amarela ou incolor. É resistente quando úmido e quebradiço quando seco.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA

Em montagem na água, o ágar apresenta-se granular e um tanto filamentosos; fragmentos de espícula de espongiários e algumas frústulas de diatomáceas podem estar presentes. Eventualmente, conforme a procedência, podem estar presentes frústulas de *Arachnoidiscus ehrenbergii* Baillon, que se caracterizam pela forma de disco de 100 µm a 300 µm de diâmetro.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DO PÓ

O ágar pulverizado apresenta coloração branca ou branco-amarelada ou levemente amarela. Em montagem em cloral hidratado os seus fragmentos são transparentes, mais ou menos granulares, estriados e angulares, podendo, ocasionalmente, conter frústulas de diatomáceas.

IDENTIFICAÇÃO

A. Dissolver aquecendo 0,1 g em 50 mL de água. Esfriar. A 1 mL da mucilagem, adicionar, cuidadosamente, 3 mL de água, de modo a formar duas camadas distintas. Adicionar 0,1 mL de solução de iodo 0,05 M. Desenvolve-se coloração castanho-violeta na interface. Agitar a mistura. O líquido adquire coloração amarelo-pálida.

B. Adicionar 0,5 mL de ácido clorídrico a 5 mL da mucilagem obtida no teste **A.** de *Identificação*. Aquecer por 30 minutos em banho-maria. Adicionar 1 mL de solução de cloreto de bário a 0,67% (p/v). Desenvolve-se turvação branca após 30 minutos.

C. Aquecer 0,5 g com 50 mL de água em banho-maria, até dissolução. Apenas uns poucos fragmentos permanecem insolúveis. Ao resfriar, a solução gelifica entre 35 °C e 30 °C. Aquecer o gel obtido em banho-maria. Não ocorre liquefação em temperatura inferior a 85 °C.

ENSAIOS DE PUREZA

Índice de intumescência (5.4.2.14). Determinar sobre amostra pulverizada até pó semifino (5.2.11). O índice de intumescência não é inferior a 10 e difere de, no máximo, 10% do valor declarado no rótulo.

Matérias estranhas insolúveis. Pesar 5 g da amostra pulverizada até pó semifino (5.2.11), adicionar 100 mL de água e 14 mL de ácido clorídrico SR. Ferver, cuidadosamente, por 15 minutos, agitando frequentemente. Filtrar o líquido quente através de funil de vidro sinterizado previamente tarado, lavar o filtro com água quente e secar a temperatura entre 100 °C a 105 °C. No máximo 1,0%.

Gelatina. Pesar 1 g da amostra, adicionar 100 mL de água e aquecer em banho-maria até dissolução. Deixar esfriar até 50 °C. A 5 mL da solução anterior, adicionar 5 mL de ácido pícrico a 10% (p/v). Não se desenvolve turbidez após 10 minutos.

Determinação de água (5.4.2.3). Determinar em 1 g da amostra pulverizada até pó semifino (5.2.11), em estufa a temperatura entre 100 °C e 105 °C, até peso constante. No máximo 20,0%.

Cinzas totais (5.4.2.4). No máximo 5,0%, em relação à substância dessecada.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos (5.5.3.1.2). Determinar pelo método de *Contagem em placa*. No máximo 1000 UFC/g.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Ausência de *Escherichia coli* e *Salmonella sp.*

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados, ao abrigo da umidade.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CATEGORIA

Adjuvante (espessante).

AZATIOPRINA COMPRIMIDOS

Contém, no mínimo, 93,0% e, no máximo, 107,0% da quantidade declarada de $C_9H_7N_7O_2S$.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada (5.2.17.1)*, utilizando celulose microcristalina, como suporte, e mistura de 1-butanol saturado com hidróxido de sódio 6 M, como fase móvel. Aplicar, separadamente, à placa, 5 µL de cada uma das soluções, recentemente preparadas, descritas a seguir.

Solução (1): pesar e pulverizar os comprimidos. Transferir quantidade de pó equivalente a 0,2 mg de azatioprina para balão volumétrico de 10 mL e completar com hidróxido de sódio 6 M. Homogeneizar e filtrar.

Solução (2): preparar solução a 20 mg/mL de azatioprina SQR em hidróxido de sódio 6 M.

Desenvolver o cromatograma. Remover a placa, deixar secar ao ar e examinar sob luz ultravioleta (254 nm). A mancha principal obtida com a *Solução (1)* corresponde em posição, cor e intensidade àquelas obtidas com a *Solução (2)*.

B. Pesar e pulverizar os comprimidos. Utilizar quantidade do pó equivalente a 20 mg de azatioprina e prosseguir conforme descrito no teste **C.** de *Identificação* da monografia de *Azatioprina*.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de peso (5.1.1). Cumpre o teste.

Teste de dureza (5.1.3.1). Cumpre o teste.

Teste de friabilidade (5.1.3.2). Cumpre o teste.

Teste de desintegração (5.1.4.1). Cumpre o teste.

Uniformidade de doses unitárias (5.1.6). Cumpre o teste.

TESTE DE DISSOLUÇÃO (5.1.5)

Meio de dissolução: água, 900 mL

Aparelhagem: pás, 50 rpm

Tempo: 30 minutos

Procedimento: após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução, filtrar e diluir em água até concentração adequada. Medir as absorvâncias das soluções em 280 nm (5.2.14), utilizando o mesmo solvente para ajuste do zero. Calcular a quantidade de $C_9H_7N_7O_2S$ dissolvida no meio, comparando as leituras obtidas com solução de azatioprina SQR na concentração de 0,001 % (p/v), preparada no mesmo solvente.

Tolerância: não menos que 75% (Q) da quantidade declarada de $C_9H_7N_7O_2S$ se dissolvem em 30 minutos.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Contagem do número total de micro-organismos mesofílos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir:

A. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no ultravioleta (5.2.14)*. Pesar e pulverizar 20 comprimidos. Transferir quantidade de pó equivalente a 0,15 g de azatioprina, para balão volumétrico de 500 mL. Dissolver em 20 mL de dimetilsulfóxido e completar o volume com ácido clorídrico 0,1 M. Filtrar. Diluir, sucessivamente, em ácido clorídrico 0,1 M até concentração de 0,00075% (p/v). Preparar a solução padrão na mesma concentração, utilizando o mesmo solvente. Medir as absorvâncias das soluções resultantes em 280 nm, utilizando ácido clorídrico 0,1 M para ajuste do zero. Calcular o teor de $C_9H_7N_7O_2S$ nos comprimidos a partir das leituras obtidas. Alternativamente, realizar os cálculos considerando $A(1\%, 1\text{ cm}) = 628$, em 280 nm, em ácido clorídrico 0,1 M.

B. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 254 nm; coluna de 300 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (10 μm); mantida a temperatura ambiente; fluxo da *Fase móvel* de 2 mL/minuto.

Fase móvel: dissolver 1 g de 1-heptanossulfonato de sódio em 700 mL de água, adicionar 300 mL de metanol, e misturar. Ajustar a solução para pH 3,5 com ácido clorídrico M.

Solução amostra: pesar e pulverizar 20 comprimidos. Transferir quantidade de pó equivalente a 50 mg de azatioprina para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 25 mL de metanol e 1 mL de hidróxido de amônio no balão, e levar ao ultrassom durante 2 minutos. Completar o volume com metanol e homogeneizar. Transferir 10 mL da solução para balão volumétrico de 50 mL, completar com água e homogeneizar.

Solução padrão: transferir 25 mg de azatioprina SQR, exatamente pesada, para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar 15 mL de metanol e 0,5 mL de hidróxido de amônio para o balão, e levar ao ultrassom durante 2 minutos. Completar o volume com metanol, e homogeneizar. Transferir 10 mL da solução para balão volumétrico de 50 mL, completar com água e homogeneizar.

Injetar replicatas de 10 μL da *Solução padrão*. A eficiência da coluna não é inferior que 800 pratos teóricos. O fator de cauda não maior que 1,5. O desvio padrão relativo das áreas de replicatas dos picos registrados não é maior que 2,0%.

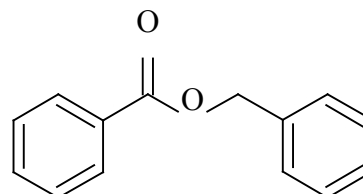
Procedimento: injetar, separadamente, 10 μL da *Solução padrão* e da *Solução amostra*, registrar os cromatogramas e medir a área dos picos. Calcular o teor de $C_9H_7N_7O_2S$ nos comprimidos a partir das respostas obtidas com a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados, protegidos da luz.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

BENZOATO DE BENZILA**Benzylis benzoas**

$C_{14}H_{12}O_2$; 212,24

benzoato de benzila; 01155

Éster fenilmetílico do ácido benzoico

[120-51-4]

Contém, no mínimo, 99,0% e, no máximo, 100,5% de $C_{14}H_{12}O_2$.

DESCRIÇÃO

Características físico-químicas. Líquido oleoso, límpido e incolor de odor fracamente aromático. Pelo resfriamento, forma cristais incolores. Seu ponto de congelamento é cerca de 17 °C.

Solubilidade. Praticamente insolúvel em água. Miscível em etanol, éter etílico, clorofórmio e óleos fixos. Praticamente insolúvel em glicerol.

Constantes físico-químicas.

Densidade relativa (5.2.5): 1,116 a 1,120.

Índice de refração (5.2.6): 1,568 a 1,570.

IDENTIFICAÇÃO

Os testes de identificação B. e C. podem ser omitidos se for realizado o teste A.

A. O espectro de absorção no infravermelho (5.2.14) da amostra, dispersa em brometo de potássio, apresenta máximos de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas daqueles observados no espectro de benzoato de benzila SQR, preparado de maneira idêntica.

B. Dissolver 2 g da amostra em 25 mL de hidróxido de potássio 0,5 M em etanol, ferver durante 20 minutos e evaporar o etanol em banho-maria. Resfriar e adicionar 20 mL de água. Extrair com duas porções de 15 mL de éter etílico e reservar a camada aquosa. Evaporar a camada etérea em banho-maria. O resíduo oleoso, incolor, constituído por álcool benzílico, apresenta ponto de ebulição entre 203 °C e 208 °C. Aquecer uma gota do resíduo com 5 mL de carbonato de sódio SR e 1 mL de permanganato de potássio SR. Produz-se odor de aldeído benzoico.

C. Adicionar 10 mL de ácido sulfúrico a 10% (p/v) à camada aquosa obtida no teste B. de Identificação. Forma-se precipitado branco, cristalino, de ácido benzoico. Lavar com água e dessecar em estufa a vácuo a 70 °C, durante 3 a 4 horas. O ponto de fusão do precipitado é de aproximadamente 121 °C.

ENSAIOS DE PUREZA

Acidez. Dissolver 1 g da amostra em 10 mL de etanol previamente neutralizado. Adicionar 0,2 mL de fenolftaleína SI e 0,2 mL de hidróxido de sódio 0,1 M SV. Desenvolve-se coloração rósea.

Aldeído. Transferir 10 g da amostra para um erlenmeyer contendo 50 mL de etanol e 5 mL de cloridrato de hidroxilamina a 3,5% (p/v). Homogeneizar e deixar em

repouso durante 10 minutos. Adicionar 1 mL de azul de bromofenol SI e titular com hidróxido de sódio 0,1 M SV até coloração levemente verde. Realizar ensaio em branco e fazer as correções necessárias. O volume de hidróxido de sódio 0,1 M consumido na preparação da amostra não deve exceder 0,5 mL (0,05% de benzaldeído).

Cinzas sulfatadas (5.2.10). Determinar em 1 g da amostra. No máximo 0,05%.

DOSEAMENTO

Pesar exatamente, cerca de 2 g da amostra, transferir para erlenmeyer e adicionar 50 mL de hidróxido de potássio etanólico 0,5 M SV. Adaptar ao frasco um condensador de refluxo e ferver durante 1 hora. Resfriar e titular o excesso de hidróxido de potássio com ácido clorídrico 0,5 M SV, acrescentando duas gotas de fenolftaleína SI. Realizar o ensaio em branco e fazer as correções necessárias. Cada mL de hidróxido de potássio 0,5 M SV equivale a 106,120 mg de $C_{14}H_{12}O_2$.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados, protegidos da luz e do calor excessivo.

ROTULAGEM

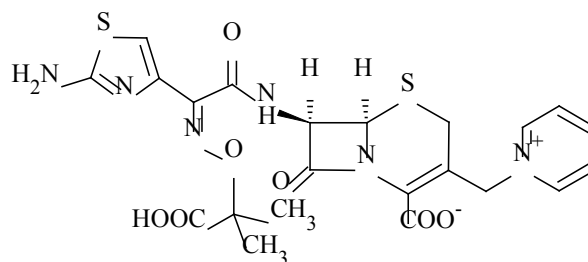
Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Escabicida.

CEFTAZIDIMA PENTAIDRATADA

Ceftazidimum pentahydricum



$C_{22}H_{22}N_6O_7S_2 \cdot 5H_2O$; 636,65

ceftazidima pentaidratada; 09370

Sal interno de 1-[[[(6*R*,7*R*)-7-[[[(2*Z*)-(2-amino-4-tiazolil) [(1-carboxi-1-metiletoxi)imino]acetil]amino]-2-carboxi-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-3-il]metil]piridínio hidratado (1:5)

[78439-06-2]

Contém, no mínimo, 95% e, no máximo, 102% de $C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$, em relação à substância dessecada.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó cristalino branco ou quase branco.

Solubilidade. Pouco solúvel em água. Pouco solúvel em metanol, praticamente insolúvel em acetona e álcool. Dissolve-se em soluções ácidas e alcalinas.

IDENTIFICAÇÃO

A. O espectro de absorção no infravermelho (5.2.14) da amostra dispersa em brometo de potássio apresenta máximos de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas daquelas observadas no espectro de ceftazidima SQR, preparado de maneira idêntica.

B. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtida no método **A.** de *Doseamento*, corresponde ao pico principal da *Solução padrão*.

ENSAIOS DE PUREZA

Aspecto da solução. A solução aquosa da amostra a 0,5% (p/v) é límpida (5.2.25) e incolor (5.2.12).

Cristalinidade. Suspender algumas partículas da amostra em óleo mineral, transferir para uma lâmina de vidro e examinar por meio de microscópio dotado de luz polarizada. As partículas exibem birrefringência, que se extingue ao movimentar a amostra por meio de ajuste micrométrico.

Limite de piridina. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência* (5.2.17.4), utilizando cromatógrafo líquido provido de detector a 255 nm, coluna de 25 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 mm); preparar as soluções imediatamente antes do uso; fluxo da *Fase móvel* de 1,0 mL/minuto.

Fase móvel: mistura filtrada e desgaseificada de uma solução contendo 28,8 g/L de fosfato de amônia dibásico previamente ajustado para pH 7,0 com amônia, acetonitrila e água (8:24:68).

Solução amostra: dissolver 0,5 g da amostra com uma solução de tampão fosfato pH 7,0 a 10% (v/v) e diluir para 100 mL com o mesmo solvente.

Solução padrão: dissolver 1 g de piridina em água e diluir para 100 mL com o mesmo solvente. Diluir 5 mL dessa solução para 200 mL com água. A 1 mL da nova solução adicionar 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 e diluir para 100 mL com água.

Solução de resolução: diluir 1 mL da *Solução amostra* para 200 mL com uma solução de tampão fosfato pH 7,0 a 10% (v/v). A 1 mL dessa solução, adicionar 20 mL de *Solução padrão* e diluir para 200 mL com solução de tampão fosfato pH 7,0 a 10% (v/v).

Injetar 20 µL da *Solução de resolução*. A resolução entre ceftazidima e o *Limite de piridina* (piridina livre) não é menor que 7,0. O desvio padrão relativo da área do pico principal obtido após seis injeções de 20 µL da *Solução padrão* não é maior que 1%.

Procedimento: injetar alternadamente 20 µL da *Solução amostra* e 20 µL da *Solução padrão*, registrar as áreas dos picos para a *Solução padrão* e *Solução amostra* e determinar a quantidade, em mg, do *Limite de piridina* (piridina livre). Não mais que 500 ppm de piridina é permitido.

Perda por dessecação (5.2.9). Determinar em 0,2 g da amostra, em estufa a vácuo, a 60 °C, sob pressão reduzida de 5 mm de mercúrio, por 3 horas. Perda entre 13% e 15%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo 0,10 UE/mg de ceftazidima.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Proceder conforme descrito para *Cromatografia a líquido de alta eficiência* (5.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 245 nm; coluna de 15 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a hexilsilil ou octilsilil (5 mm); fluxo da *Fase móvel* de 2 mL/minuto.

Fase móvel: dissolver 4,26 g de fosfato dissódico e 2,73 g de fosfato monopotássico em 980 mL de água, adicionar 20 mL de acetonitrila. Ajustar para pH 7,0 com ácido fosfórico. Filtrar com membrana de 1 µm ou menos, e desgaseificar. Fazer ajustes se necessário.

Solução amostra: dissolver exatamente 25 mg da amostra em *Fase móvel* e completar o volume para 25 mL utilizando o mesmo solvente.

Solução padrão: dissolver exatamente 25 mg de ceftazidima SQR em *Fase móvel* e completar o volume para 25 mL utilizando o mesmo solvente.

Solução de resolução: Dissolver exatamente 5 mg de ceftazidima delta-3-isômero SQR em 5 mL da *Solução padrão*.

Injetar 20 µL da *Solução de resolução*. Ajustar a sensibilidade do sistema logo que as alturas dos dois picos principais obtidos no cromatograma da *Solução de resolução* sejam pelo menos 50% do tamanho natural registrado. A resolução entre ceftazidima e ceftazidima delta-3-isômero SQR não é menor que 1.

Procedimento: injetar separadamente 20 µL da *Solução amostra* e 20 µL da *Solução padrão*. Registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. Calcular o teor de $C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$ na amostra a partir das respostas obtidas com a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.

B. Proceder conforme descrito em *Ensaio microbiológico de antibióticos por difusão em ágar (5.5.3.3.1)*, utilizando cilindros.

Micro-organismo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Meios de cultura: meio de cultura número 2 para a camada base e meio de cultura número 1 para a camada de superfície.

Solução amostra: preparar a solução estoque em água destilada. Preparar soluções da amostra diluída em *Tampão fosfato pH 6,0* nas concentrações equivalentes a 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL de ceftazidima em água destilada.

Solução padrão: preparar a solução estoque em água destilada. Preparar soluções diluídas de ceftazidima SQR em *Tampão fosfato pH 6,0* nas concentrações de 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL em água destilada.

Procedimento: adicionar 21 mL de meio de cultura número 2 em cada placa, esperar solidificar, adicionar 4 mL do meio de superfície número 1 contendo o inóculo a 0,5% e proceder conforme descrito em *Ensaio microbiológico de antibióticos por difusão em ágar (5.5.3.3.1)*, utilizando cilindros, adicionando aos cilindros 0,2 mL das soluções recentemente preparadas. Calcular a potência da amostra, em µg de ceftazidima por miligrama, a partir da potência do padrão e das respostas obtidas com a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes hermeticamente fechados. Sendo destinado à produção de formas farmacêuticas injetáveis, deverá ser embalado em recipientes estéreis.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Antibiótico.

CEFTAZIDIMA PÓ PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL

Contém, no mínimo, 90% e, no máximo, 105% em relação à substância dessecada e livre de carbonato de sódio ou arginina e, no mínimo, 90% e, no máximo, 120% da quantidade declarada de ceftazidima. Ceftazidima pó para solução injetável é uma mistura estéril de ceftazidima com carbonato de sódio ou arginina.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito no método **B.** de *Identificação* da monografia de *Ceftazidima pentaidratada*.

B. Dissolver a amostra em ácido clorídrico *M* com efervescência. Borbulhar o gás produzido em hidróxido de cálcio SR. Há a formação de um precipitado branco imediatamente.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). 5,0 a 7,5, numa solução constituída no recipiente selado, tomando o cuidado de eliminar a pressão dentro do recipiente durante a reconstituição, contendo 100 mg de ceftazidima por mL.

Determinação de peso (5.1.1). Cumpre o teste.

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

Uniformidade de doses unitárias (5.1.6). Cumpre o teste.

ENSAIOS DE PUREZA

Conteúdo de carbonato de sódio (se presente).

Solução de cloreto de potássio: dissolver 19,07 g de cloreto de potássio para 1000 mL com água.

Solução padrão: dissolver quantidade de cloreto de sódio, previamente dessecado a 105 °C por 2 horas, em água para obter uma solução de concentração de 14 µg/mL. Transferir 10 mL desta solução para balão volumétrico de 100 mL, adicionar 10 mL de *Solução*

de cloreto de potássio e completar volume com mesmo solvente.

Solução amostra: utilizar solução estoque, descrita em *Solução amostra 1*, no método **B**. **Doseamento.** Diluir quantitativamente, passo a passo, se necessário, com água, para obter solução contendo aproximadamente 12,5 µg/mL de carbonato de sódio. Transferir 10 mL desta solução para balão volumétrico de 100 mL, adicionar 10 mL de solução de cloreto de potássio e completar volume com mesmo solvente.

Solução branco: transferir 10 mL de *Solução de cloreto de potássio* para balão volumétrico de 100 mL, diluir com água para completar o volume.

Procedimento: determinar as absorvâncias da *Solução padrão* e da *Solução amostra* em 589 nm, utilizando espectrofotômetro de absorção atômica (**5.2.13.1**), equipado com lâmpada de sódio e chama de acetileno, utilizando a *Solução branco* para ajuste do zero. Calcular a porcentagem de carbonato de sódio, segundo a expressão:

$$\left(\frac{105,99}{116,88}\right) \times \left(\frac{0,1C}{M}\right) \times \left(\frac{Au}{As}\right)$$

em que

105,99 = peso molecular do carbonato de sódio;

116,88 = dobro do peso molecular do cloreto de sódio;

C = concentração, em µg/mL, de cloreto de sódio na *Solução padrão*;

M = quantidade, em mg, de ceftazidima pó para solução injetável em cada mL da *Solução amostra*, baseada na quantidade usada para preparar a solução estoque e na diluição;

Au e *As* = absorvâncias da *Solução amostra* e da *Solução padrão*, respectivamente.

Usar esta porcentagem, correspondente à base anidra e livre de carbonato de sódio, no cálculo do método **B**, de *Doseamento* em *Solução amostra 1*.

Conteúdo de arginina (se presente).

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência* (**5.2.17.4**). Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 206 nm; coluna analítica de 25 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo dihidroxipropano (diol) (3 a 10 µm) e uma pré-coluna de 50 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno empacotada com sílica (30 a 50 µm); fluxo da *Fase móvel* de 1 mL/minuto.

Fase móvel: dissolver 1,15 g de fosfato de amônio monobásico em aproximadamente 800 mL de água. Ajustar o pH para 2,0 ± 0,1 com ácido fosfórico e diluir para 1000 mL com água. Preparar mistura filtrada e desgasificada de acetonitrila e da solução previamente descrita (750:250). Fazer ajustes, se necessário.

Solução padrão: dissolver quantidade de ceftazidima pentaidratada SQR e L-arginina SQR em água para obter solução de concentração 0,2 mg/mL.

Solução amostra: dissolver quantidade de amostra em água para obter solução de concentração 0,2 mg/mL.

Procedimento: injetar, separadamente, 20 µL da *Solução padrão* e da *Solução amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. O fator de cauda é no máximo 4,0. A resolução entre ceftazidima e arginina é no mínimo 6,0. Calcular o teor de arginina na amostra, segundo a expressão:

$$100 \left(\frac{Cs}{Cu}\right) \times \left(\frac{ru}{rs}\right)$$

em que

Cs = concentração, em mg/mL, de L-arginina SQR na *Solução padrão*;

Cu = concentração, em mg/mL, de ceftazidima pó para solução injetável na *Solução amostra*;

ru e *rs* = áreas sob os picos de arginina obtidas para a *Solução amostra* e para a *Solução padrão*, respectivamente.

Utilizar esta porcentagem, correspondente à base anidra e livre de arginina, no cálculo do método **B**, de *Doseamento* em *Solução amostra 1*.

Limite de piridina.

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência* (**5.2.17.4**). Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 254 nm, coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm); fluxo da *Fase móvel* de 1,6 mL/minuto.

Fase móvel: misturar acetonitrila, fosfato de amônio monobásico 0,25 M e água (300:100:600) ajustando o pH para $7,0 \pm 0,1$ com hidróxido de amônio. Filtrar em membrana de poro de 1 μm de diâmetro e desgaseificar. Fazer ajustes se necessário.

Tampão pH 7,0: dissolver 5,68 g de fosfato de sódio dibásico anidro e 3,63 g de fosfato de potássio monobásico em água para completar 1000 mL. Ajustar o pH com ácido fosfórico, se necessário.

Solução padrão: transferir, cerca de, 250 mg de piridina, previamente pesados, para balão volumétrico de 100 mL e diluir em água. Imediatamente antes da cromatografia, transferir 2 mL desta solução para balão volumétrico de 200 mL, diluir com *Tampão pH 7,0* para obter solução com concentração final de 25 $\mu\text{g/mL}$ de piridina.

Solução amostra: transferir, cerca de, 660 mg de ceftazidima pó para solução injetável, previamente removida do frasco-ampola e pesada, para balão volumétrico de 100 mL e diluir com *Tampão pH 7,0*. Esta solução deve ser armazenada em local frio e utilizada dentro de, no máximo, uma hora.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 μL da *Solução amostra* e da *Solução padrão*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos de piridina. O fator de cauda é no máximo 2,5. O desvio padrão relativo das áreas de replicatas sob os picos registrados é no máximo 3%. Calcular o teor de piridina na amostra, segundo a expressão:

$$10 \left(\frac{C}{W} \right) \times \left(\frac{ru}{rs} \right)$$

em que

C = concentração, em $\mu\text{g/mL}$, de piridina na *Solução padrão*;

W = peso, em mg, de ceftazidima pó para solução injetável;

ru e rs = áreas sob os picos obtidas para a *Solução amostra* e para a *Solução padrão*, respectivamente.

No máximo 0,4% de piridina são encontradas no conteúdo de carbonato de sódio; e no máximo 0,3% no conteúdo de arginina.

Perda por dessecação (5.2.9). Secar, cerca de, 0,3 g de amostra, previamente pesada, em estufa, a 25 °C, sob pressão máxima de 5 mmHg, por 4 horas. Na amostra contendo arginina, a perda é no máximo 12,5% do peso. Na amostra contendo carbonato de sódio, a perda é no máximo 13,5% do peso. Na amostra com arginina, usar

a percentagem de perda, m , para calcular a substância dessecada e livre de arginina, no resultado da *Solução amostra 1*, em *Doseamento*. Na amostra com carbonato de sódio, aquecer o resíduo, sob pressão máxima de 5 mmHg, a 100 °C por 3 horas, e calcular a percentagem total de peso perdido. Usar esse percentual, m , para calcular a substância dessecada e livre de carbonato de sódio, no resultado da *Solução amostra 1*, obtida no método **B**. de *Doseamento*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Endotoxinas Bacterianas (5.5.2.2). No máximo 0,10 UE/mg de ceftazidima.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Empregar o método de filtração por membrana. Cumprir o teste.

DOSEAMENTO

A. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 254 nm; coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 μm); fluxo da *Fase móvel* de 2 mL/minuto.

Tampão pH 7,0: dissolver 42,59 g de fosfato de sódio dibásico anidro e 27,22 g de fosfato de potássio monobásico em água para completar 1000 mL. Ajustar o pH com ácido fosfórico, se necessário.

Fase móvel: misturar 40 mL de acetonitrila e 200 mL de *Tampão pH 7,0* e diluir com água para obter volume final de 2000 mL. Filtrar com filtro de porosidade de 1 μm ou menos e desgaseificar. Fazer ajustes se necessário.

Solução amostra 1: transferir quantidade previamente pesada da amostra, equivalente a 250 mg de ceftazidima, para balão volumétrico de 250 mL. Diluir com água até completar o volume para obter a solução estoque. Proteger esta solução da luz. Imediatamente antes da injeção, transferir 5 mL dessa solução para balão volumétrico de 50 mL. Diluir com água para completar o volume.

Solução amostra 2 (utilizado para os recipientes de dose única): reconstituir o pó de ceftazidima para solução injetável em água, conforme especificado no rótulo do medicamento. Retirar todo o conteúdo do recipiente utilizando uma agulha hipodérmica. Diluir quantitativamente a solução com água para obter uma solução final de 1 mg/mL. Proteger esta solução estoque da luz. Imediatamente antes da injeção, transferir 5 mL desta solução para balão volumétrico de 50 mL. Diluir com água para completar o volume.

Solução amostra 3 (utilizado quando a quantidade de ceftazidima é fornecida no volume da solução reconstituída): reconstituir o pó de ceftazidima para

solução injetável em água, volume previamente medido, correspondente ao volume de solução constituinte conforme especificado no rótulo do medicamento. Diluir quantitativamente um volume previamente medido desta solução com água, para obter uma solução final de 1 mg/mL. Proteger esta solução estoque da luz. Imediatamente antes da injeção, transferir 5 mL desta solução para balão volumétrico de 50 mL. Diluir com água para completar o volume.

Solução padrão: transferir cerca de 29 mg de ceftazidima pentaidratada SQR para balão volumétrico de 25 mL, contendo 2,5 mL de *Tampão pH 7,0*, misturar até completa dissolução. Diluir com água para completar o volume. Proteger esta solução estoque da luz. Imediatamente antes da injeção, transferir 5 mL desta solução estoque para balão volumétrico de 50 mL, diluir com água para completar o volume. Esta solução contém aproximadamente 100 µg/mL de ceftazidima.

Solução de resolução: preparar uma solução do isômero delta 3 de ceftazidima SQR em *Tampão pH 7,0* para obter solução final de concentração 0,1 mg/mL. Imediatamente antes da injeção, misturar 1 mL desta solução com 8 mL de água e 1 mL da solução estoque utilizada para preparar a *Solução padrão*.

Procedimento: injetar, separadamente, 20 µL da *Solução padrão* e da *Solução amostra* e medir as áreas sob os picos. Para a *Solução amostra 2* e a *Solução amostra 3*, calcular a quantidade, em mg, de ceftazidima na amostra analisada, segundo a expressão:

$$C \times \left(\frac{ru}{rs} \right)$$

em que

C = concentração, em µg/mL, de ceftazidima na *Solução padrão*;

ru e *rs* = áreas sob os picos obtidas com a *Solução amostra* e a *Solução padrão*, respectivamente.

Para a *Solução amostra 1*, calcular o teor de ceftazidima dessecada e livre de carbonato de sódio ou arginina numa amostra de ceftazidima pó para solução injetável, segundo a expressão:

em que

C = concentração em µg/mL de ceftazidima na *Solução padrão*;

W = quantidade, em mg, de ceftazidima pó para solução injetável usado para preparar a *Solução amostra 1*;

m = quantidade de perda por dessecação;

s = porcentagem de carbonato de sódio ou arginina presente na amostra;

ru e *rs* = áreas sob os picos obtidas com a *Solução amostra* e a *Solução padrão*, respectivamente.

Calcular a quantidade em mg, de ceftazidima, retirada do recipiente de origem, ou na porção da solução reconstituída, segundo a expressão:

$$\left(\frac{L}{D} \right) \times C \times \left(\frac{ru}{rs} \right)$$

em que

L = valor rotulado, em mg, de ceftazidima no recipiente, ou no volume da solução reconstituída;

D = concentração, em µg/mL, de ceftazidima na *Solução amostra 2* ou na *Solução amostra 3*, baseado no valor rotulado do recipiente ou na porção da solução reconstituída, respectivamente, e na diluição.

B. Proceder conforme descrito em *Ensaio microbiológico de antibióticos por difusão em ágar (5.5.3.3.1)*, utilizando cilindros. Reconstituir o conteúdo de 10 frascos conforme indicado pelo produtor.

Micro-organismo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Meios de cultura: meio de cultura número 2 para a camada base e meio de cultura número 1 para a camada de superfície.

Solução amostra: preparar a solução estoque em água destilada. Preparar soluções da amostra diluída em *Tampão fosfato pH 6,0* em concentrações equivalentes a 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL de ceftazidima em água destilada.

Solução padrão: preparar a solução estoque em água destilada. Preparar soluções diluídas de ceftazidima SQR em *Tampão fosfato pH 6,0* nas concentrações de 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL em água destilada.

Procedimento: adicionar 21 mL de meio de cultura número 2 em cada placa, esperar solidificar, adicionar 4 mL do meio de superfície número 1 contendo o inóculo a 0,5% e proceder conforme descrito em *Ensaio microbiológico de antibióticos por difusão em ágar (5.5.3.3.1)*, utilizando cilindros, adicionando aos cilindros 0,2 mL das soluções recentemente preparadas. Calcular a potência da amostra, em µg de ceftazidima por miligrama, a partir da potência do padrão e das respostas obtidas com a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes hermeticamente fechados.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CITALOPRAM COMPRIMIDOS

Contém, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 110,0% da quantidade declarada de $C_{20}H_{21}FN_2O$. Os comprimidos podem ser revestidos.

IDENTIFICAÇÃO

A. O espectro de absorção no ultravioleta (5.2.14), na faixa de 200 nm a 400 nm, da solução a 0,001% (p/v) de citalopram em ácido clorídrico 0,1 M, exibe máximo em 239 nm, idêntico ao observado no espectro de solução similar de citalopram SQR.

B. O tempo de retenção do pico principal da *Solução amostra* obtida no método **B.** de *Doseamento* corresponde àquele do pico principal da *Solução padrão*.

C. Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada* (5.2.17.1), utilizando sílica-gel GF₂₅₄, como suporte, e mistura de água, 1-butanol e ácido acético (15:12:3) como fase móvel. Preparar a fase móvel com 24 horas de antecedência. Após desprezar a camada orgânica, aplicar separadamente, à placa, 5 µL de cada uma das soluções, recentemente preparadas, descritas a seguir.

Solução (1): pesar e pulverizar 20 comprimidos. Transferir quantidade do pó equivalente a 10 mg de citalopram com auxílio de 7 mL de água. Submeter a banho de ultrassom a temperatura ambiente por 10 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente, agitar e filtrar.

Solução (2): preparar a solução a 1 mg/mL de citalopram SQR em água.

Desenvolver o cromatograma. Remover a placa, deixar secar ao ar. Examinar sob luz ultravioleta (254 nm). A mancha principal obtida com a *Solução (1)* corresponde em posição, cor e intensidade àquela obtida com a *Solução (2)*.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de peso (5.1.1). Cumpre o teste.

Teste de dureza (5.1.3.1). Cumpre o teste.

Teste de desintegração (5.1.4.1). Cumpre o teste.

Uniformidade de doses unitárias (5.1.6). Cumpre o teste. Proceder conforme descrito no método **B.** de *Doseamento*. Preparar solução com concentração final de 40 µg/mL.

TESTE DE DISSOLUÇÃO (5.1.5)

Meio de dissolução: ácido clorídrico 0,1 M, 900 mL

Aparelhagem: cestas, 50 rpm

Tempo: 30 minutos

Procedimento: após o teste, retirar alíquota de 10 mL do meio de dissolução e filtrar com auxílio de filtro quantitativo. Proceder conforme descrito no método **B.** de *Doseamento* da monografia *Bromidrato de citalopram*, utilizando as alíquotas filtradas como *Solução amostra*. Calcular a quantidade de $C_{20}H_{21}FN_2O$ dissolvida no meio, comparando as áreas sob os picos obtidos com a área de uma solução de citalopram SQR na concentração de 22 µg/mL em base, preparada no mesmo solvente.

Tolerância: não menos que 80% (Q) da quantidade declarada de $C_{20}H_{21}FN_2O$ se dissolvem em 30 minutos.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Contagem do número total de micro-organismos mesofílos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no ultravioleta* (5.2.14). Pesar e pulverizar 20 comprimidos. Transferir quantidade do pó equivalente a 10 mg de citalopram com auxílio de 30 mL de ácido clorídrico 0,1 M para balão volumétrico de 50 mL. Submeter a banho de ultrassom por 10 minutos e completar o volume com o mesmo solvente. Filtrar. Diluir, sucessivamente, com o mesmo solvente, até concentração final de 0,001% (p/v). Preparar a solução padrão na mesma concentração utilizando o mesmo solvente. Medir as absorvâncias das soluções em 239 nm, utilizando ácido clorídrico 0,1 M para ajuste do zero. Calcular a quantidade de $C_{20}H_{21}FN_2O$ nos comprimidos, a partir das respostas obtidas para as soluções padrão e amostra.

B. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência* (5.2.17.4). Proceder conforme descrito no método **B.** de *Doseamento* da monografia *Bromidrato de Citalopram*. Preparar a *Solução amostra* como descrito a seguir.

Solução amostra: pesar e pulverizar 20 comprimidos. Transferir quantidade de pó equivalente a 10 mg de citalopram para balão volumétrico de 50 mL e adicionar 40 mL de água, com pH ajustado a 1,85 com ácido fosfórico a 10% (p/v). Submeter a banho de ultrassom a temperatura ambiente por 10 minutos. Completar o

volume com o mesmo solvente, agitar e filtrar. Transferir alíquota equivalente a 5 mL para balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com água com pH ajustado a 1,85 com ácido fosfórico a 10% (p/v).

Procedimento: injetar, separadamente, 20 µL da *Solução padrão* e da *Solução amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. Calcular a quantidade de $C_{20}H_{21}FN_2O$, nos comprimidos a partir das respostas obtidas com a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

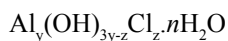
Em recipientes bem fechados, protegidos da luz e em temperatura ambiente.

ROTULAGEM

Observar legislação vigente.

CLORIDRÓXIDO DE ALUMÍNIO

Aluminium hydroxydatum chloratum



cloridrato de alumínio; 02454

[1327-41-9]

cloridrato de alumínio; 09695

[12042-91-0]

Os cloridratos de alumínio são complexos poliméricos hidratados, abrangendo uma faixa de razão entre os átomos de alumínio e cloro de 1,91:1 a 2,10:1. Contém, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 110,0% da quantidade rotulada de cloridrato de alumínio anidro $[Al_y(OH)_{3y-z}Cl_z]$.

IDENTIFICAÇÃO

A solução aquosa da amostra a 10% (p/v), responde às reações dos íons alumínio e cloreto (5.3.1.1).

ENSAIOS DE PUREZA

pH (5.2.19). 3,0 a 5,0. Determinar em solução aquosa a 15% (p/v).

Conteúdo de alumínio. Pesar 0,2 g da amostra, transferir para béquer de 150 mL, adicionar 20 mL de

água e 5 mL de ácido clorídrico. Manter em ebulição durante 5 minutos. Deixar esfriar. Em seguida, adicionar 25 mL de edetato dissódico 0,1 M SV e ajustar o pH para $4,7 \pm 0,1$ com hidróxido de amônio ou ácido acético M. Adicionar 20 mL de tampão ácido acético-acetato de amônio, 50 mL de etanol e 5 mL de ditizona SR. O pH dessa solução deve ser de $4,7 \pm 0,1$. Titular com sulfato de zinco 0,1 M SV até surgimento de coloração rosa-púrpura. Realizar prova em branco. Cada mL de edetato dissódico 0,1 M SV consumido equivale a 2,698 mg de alumínio. Usar o resultado obtido para calcular a razão atômica de alumínio/cloro.

Conteúdo de cloreto. Pesar 0,7 g da amostra, transferir para béquer de 250 mL, adicionar 100 mL de água e 10 mL de ácido nítrico M. Agitar até a solubilização e titular com nitrato de prata 0,1 M SV, determinando o ponto final potenciométricamente, utilizando um eletrodo prata-cloreto de prata. Cada mL de nitrato de prata 0,1 M SV equivale a 3,545 mg de cloreto. Usar o resultado obtido para calcular a razão atômica de alumínio/cloro.

Arsênio (5.3.2.5). Determinar em 1,5 g de amostra. No máximo 0,0002% (2 ppm).

Ferro (5.3.2.4). Utilizar o *Método I*. Pesar 0,667 g da amostra e acrescentar 40 mL de água. No máximo 0,015% (150 ppm).

Metais pesados (5.3.2.3). Utilizar o *Método I*. Pesar 1 g da amostra e adicionar 40 mL de água. Ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com hidróxido de amônio 6 M. Proceder conforme descrito em *Ensaio limite para metais pesados* utilizando 2 mL da *Solução padrão de chumbo (10 ppm Pb)*. No máximo 0,002% (20 ppm).

Razão atômica alumínio/cloro. Dividir o percentual de alumínio encontrado em teste para *Conteúdo de alumínio* pelo percentual de cloro encontrado no teste para *Conteúdo de cloro* e multiplicar por 35,453/26,98. Onde, 35,453 é a massa atômica do cloro e 26,98 é a massa atômica do alumínio. Entre 1,90:1 e 2,10:1.

Água (5.2.20.1). No máximo 18,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA.

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpra o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpra o teste.

DOSEAMENTO

Calcular a porcentagem do cloridrato de alumínio, segundo a expressão:

$$Al \{ 26,98x + [17,01(3x - 1)] + 35,453 \} / 26,98x$$

em que Al é o percentual de alumínio encontrado no teste para *Conteúdo de alumínio*, x é a razão atômica

alumínio/cloro encontrada no teste para *Razão atômica alumínio/cloro*, 26,98 é a massa atômica do alumínio, 17,01 é a massa atômica do ânion hidróxido e 35,453 é a massa atômica do cloro.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

COLA DE FIBRINA

Fibrini glutinum

DEFINIÇÃO

Cola de fibrina é uma preparação farmacêutica, estéril e aprotogênica, constituída por um conjunto contendo dois componentes: o componente 1 (concentrado de fibrinogênio), uma fração proteica que contém fibrinogênio humano e Fator XIII humano, e o componente 2, uma preparação que contém trombina humana; este último componente converte o primeiro em fibrina depois de sua reconstituição e mistura em presença de íons cálcio.

Pode conter outros ingredientes como a fibronectina humana e um inibidor de plasmina, como a aprotinina, e estabilizadores, como a albumina humana, adicionados antes ou durante a formação da fibrina induzida pela trombina. Nenhum antimicrobiano é adicionado à preparação.

Os constituintes são obtidos a partir do plasma humano, que cumpre os requisitos da monografia *Plasma Humano para Fracionamento*.

Descongelado ou reconstituído com o volume do diluente indicado no rótulo, o componente 1 contém no mínimo 40 g/L de proteínas coaguláveis; a atividade de trombina do componente 2 varia em um amplo intervalo (aproximadamente 4 - 1000 UI/mL).

PRODUÇÃO

Sua obtenção deve ser de acordo com o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos Biológicos e Boas Práticas do Ciclo Produtivo do Sangue, conforme a legislação vigente, visando garantir a sua qualidade, segurança e eficácia.

O método de preparação inclui uma ou várias etapas de inativação viral que demonstrem a eliminação ou

inativação dos agentes infecciosos virais conhecidos. Caso sejam usadas substâncias para inativar os vírus durante a produção, o processo de purificação posterior deve demonstrar, mediante validação, que a concentração das substâncias inativadoras foi eliminada ou reduzida a níveis aceitáveis segundo normas vigentes e que os eventuais resíduos não possam vir a trazer riscos aos pacientes.

Os constituintes ou as suas misturas devem ser estéreis e aprotogênicos, sendo então distribuídos asépticamente nos recipientes finais e imediatamente congelados. Os mesmos devem ser liofilizados e os recipientes fechados sob vácuo ou sob gás inerte de forma que se evite qualquer contaminação microbiana.

Caso o componente 1 contenha Fator XIII, a concentração deste último não deverá ser superior a 10 UI/mL. Caso o rótulo venha indicar que a atividade do Fator XIII da coagulação é maior que 10 UI/mL, a atividade estimada não deve ser inferior a 80% e nem superior a 120% da atividade declarada no rótulo.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Os constituintes liofilizados são pós ou sólidos friáveis de cor branca ou amarelo pálido. Os constituintes congelados são sólidos opacos, incolores ou amarelo pálido. Os constituintes líquidos são incolores ou amarelo pálido.

COMPONENTE 1 (CONCENTRADO DE FIBRINOGENIO)

Nota: reconstituir os constituintes liofilizados e descongelar os constituintes congelados como indicado no rótulo imediatamente antes de realizar a identificação e os ensaios, exceto os de solubilidade e água.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder aos ensaios de precipitação com a amostra do produto acabado, usando soros específicos de pelo menos quatro diferentes espécies animais e um soro anti-humano. O ensaio é realizado com soros específicos contra as proteínas plasmáticas das espécies animais que normalmente se usam no país para a preparação de produtos de origem biológica. A amostra contém somente proteínas de origem humana e não precipita com os soros específicos contra as proteínas plasmáticas de outras espécies animais, porém precipita frente ao soro anti-humano.

B. A determinação do fibrinogênio, conforme descrito em *Doseamento*, contribui para a identificação do componente 1.

C. A determinação do Fator XIII, conforme descrito em *Doseamento*, contribui para a identificação do componente 1.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto da solução. Os concentrados liofilizados dissolvem-se em 20 minutos no volume do diluente para a sua reconstituição, à temperatura indicada no rótulo, resultando em uma solução límpida ou ligeiramente turva, praticamente incolor.

pH (5.2.19). 6,5 a 8,0.

Estabilidade da dissolução. Durante os 120 minutos que seguem à reconstituição ou ao descongelamento não se forma nenhum gel, à temperatura ambiente.

Água. Determinar por um dos métodos a seguir: *Determinação da água pelo método semimicro* (5.2.20.3), *Perda por dessecação* (5.2.9) ou *Espectrofotometria de absorção no infravermelho próximo* (5.2.14). Não mais que 2,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Fibrinogênio (proteínas coaguláveis)

Empregar um dos métodos descritos a seguir:

A quantidade estimada de proteínas coaguláveis, expressa em miligramas, não é inferior a 70% nem superior a 130% da quantidade declarada.

A. Proteínas coaguláveis. Dosar o nitrogênio no resíduo pelo método de *Determinação de nitrogênio* (5.3.3.2).

Misturar 0,2 mL da preparação reconstituída e 2 mL de uma solução tampão apropriada (pH 6,6 a 7,4) que contenha uma quantidade suficiente de trombina humana (aproximadamente 3 UI/mL) e cálcio (0,05 M).

Manter a mistura a 37 °C durante 20 minutos, separar o precipitado por centrifugação (5000 g, por 20 minutos) e lavar exaustivamente com uma solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v). Dosar o nitrogênio no resíduo pelo método de *Determinação de nitrogênio* (5.3.3.2). Calcular o teor em proteínas devendo ser o resultado multiplicado por 6.

B. Teste de coagulação. Diluir a preparação reconstituída com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até obter uma concentração de fibrinogênio compreendida entre 0,1 mg/mL e 1 mg/mL. Utilizar 0,2 mL da diluição, mantendo a 37 °C durante 60 segundos e adicionar 0,2 mL de uma solução apropriada de trombina humana (aproximadamente 20 UI/mL e que contenha pelo menos 1 mM de cálcio). Determinar o tempo de coagulação por um método apropriado. Repetir o processo com pelo menos três diluições diferentes, no intervalo indicado anteriormente por meio de uma solução apropriada

de fibrinogênio (por exemplo, plasma humano normal calibrado, por meio de uma determinação, frente a uma mistura de plasma recém preparada (> 10 doadores). Representar uma curva de calibração com os tempos de coagulação medidos para as diluições padrão e o conteúdo em fibrinogênio; a partir da curva, determinar o conteúdo de fibrinogênio na preparação a examinar.

Fator XIII. Onde o rótulo indicar que a atividade do Fator XIII da coagulação é maior que 10 UI/mL, a atividade estimada não deve ser inferior a 80% e nem superior a 120% da atividade declarada no rótulo.

Fazer três diluições do componente 1 descongelado ou reconstituído e da preparação de referência de plasma humano normal, usando como diluente plasma deficiente em Fator XIII da coagulação ou outro diluente apropriado. Adicionar a cada diluição quantidades apropriadas dos seguintes reagentes:

Reagente ativador: contendo trombina humana ou bovina, tampão apropriado, cloreto de cálcio e um inibidor apropriado tal como Gli-Pro-Arg-Ala-Ala-NH₂, que inibirá a coagulação da amostra e não evitará a ativação do Fator XIII pela trombina.

Reagente de detecção: contendo substrato peptídico específico de Fator XIII ativado tal como Leu-Gli-Pro-Gli-Glu-Ser-Lis-Val-Ile-Gli-NH₂ e éster de etil glicina como segundo substrato em solução tampão adequada.

Reagente NADH: contendo glutamato desidrogenase, α -cetoglutarato e NADH em solução tampão adequada.

Após a mistura, são mensuradas as variações de absorbância (ΔA /minutos) no comprimento de onda de 340 nm (5.2.14) após ser atingida a fase linear da reação. A unidade de Fator XIII é igual à atividade de 1 mL de plasma humano normal. Calcular a atividade da preparação teste através de métodos estatísticos usuais (8). Os limites de confiança ($P = 0,95$) não devem ser inferiores a 80% e nem superiores a 125% da atividade estimada.

COMPONENTE 2 (PREPARAÇÃO DE TROMBINA)

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder aos ensaios de precipitação com a amostra do produto acabado, usando soros específicos de pelo menos quatro diferentes espécies animais e um soro anti-humano. O ensaio é realizado com soros específicos contra as proteínas plasmáticas das espécies animais que normalmente se usam no país para a preparação de produtos de origem biológica. A amostra contém somente proteínas de origem humana e não precipita com os soros específicos contra as proteínas plasmáticas de outras espécies animais, porém precipita frente ao soro anti-humano.

B. A determinação da trombina, conforme descrito em *Doseamento*, contribui para a identificação do componente 2.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto da solução. Os concentrados liofilizados dissolvem-se em 5 minutos no volume de diluente para a sua reconstituição, à temperatura indicada no rótulo, resultando em uma solução incolor e límpida ou ligeiramente turva.

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

Água. Determinar por um dos métodos a seguir: *Determinação da água pelo método semimicro* (5.2.20.3), *Perda por dessecação* (5.2.9) ou *Espectrofotometria de absorção no infravermelho próximo* (5.2.14). Não mais que 2,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Trombina. Se necessário, diluir a preparação reconstituída a ser examinada a aproximadamente 2 -20 UI por mililitro de trombina usando como diluente um tampão pH 7,3 - 7,5, tal como a solução tampão de imidazol pH 7,3, contendo 10 g/L de albumina humana ou albumina bovina. A um volume adequado da diluição, adicionar volume apropriado de fibrinogênio (1 g/L de proteína coagulada) aquecido a 37 °C e começar a medir o tempo de coagulação imediatamente. Repetir o procedimento com cada uma das três diluições de uma preparação de referência de trombina calibrada em unidades internacionais. Calcular a atividade da preparação teste por meio de métodos estatísticos usuais (8). Os limites de confiança (P=0,95) não devem ser inferiores a 80% e nem superiores a 125% da atividade estimada.

ARMAZENAMENTO

Protegido da luz.

ROTULAGEM

Observar legislação vigente. O rótulo deve indicar:

a quantidade de fibrinogênio (miligramas de proteínas coaguláveis) e de trombina (Unidades Internacionais) por frasco;

a atividade de Fator XIII (unidades) quando superior a 10 UI/mL;

quando aplicável, o volume de diluente necessário para reconstituir a preparação.

COMPLEXO PROTROMBÍNICO HUMANO TOTAL LIOFILIZADO

Prothrombinum Multiplex Total Humanum Cryodesiccatus

O complexo protrombínico humano total é uma fração de proteínas plasmáticas que contém, obrigatoriamente, os Fatores II, VII, IX e X da coagulação humana. A presença e as quantidades dos Fatores II, VII e X dependem do método de fracionamento utilizado e sua obtenção é realizada a partir do plasma humano que satisfaça as condições da monografia *Plasma Humano para Fracionamento*.

A atividade da preparação, reconstituída de acordo com as indicações que figuram no rótulo, não é inferior a 20 UI de Fator IX por mililitro. Se o conteúdo de algum fator de coagulação estiver declarado em valor unitário, a potência estimada deve estar entre 80% e 125% da potência declarada; se o conteúdo de algum fator estiver declarado em intervalo, a potência estimada deve estar dentro dos limites mínimo e máximo declarados.

O método de preparação deve evitar, tanto quanto possível, a ativação dos fatores da coagulação, de modo a reduzir seu potencial trombogênico, e compreende uma ou várias etapas que demonstrem a eliminação ou inativação dos agentes infecciosos conhecidos e não conhecidos. Se forem acrescentadas substâncias para inativação viral na etapa de produção, um procedimento de purificação deve ser validado, de modo a demonstrar que a concentração dessas substâncias foi reduzida a um nível aceitável, e que tais resíduos não comprometem a segurança da preparação.

A atividade específica não é inferior a 0,6 UI do Fator IX por miligrama de proteínas totais, antes da eventual adição de um estabilizante proteico. A fração que contém o complexo protrombínico é dissolvida em diluente apropriado. Podem ser adicionadas heparina, antitrombina e outras substâncias auxiliares, como um estabilizante. Não deve ser adicionado nenhum conservante antimicrobiano. A solução sofre uma filtração esterilizante e depois é envasada, asépticamente, nos recipientes e, imediatamente, congelada. Em seguida é liofilizada e os recipientes são fechados a vácuo ou em presença de um gás inerte.

Nota: reconstituir a amostra como indicado no rótulo imediatamente antes de realizar a Identificação, os ensaios (exceto os de solubilidade e de teor de água) e o Doseamento.

IDENTIFICAÇÃO

A amostra satisfaz os limites estabelecidos em *Doseamento* para os Fatores II, VII, IX e X da coagulação sanguínea humana.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Pó ou sólido friável, branco ou ligeiramente corado, muito higroscópico.

Osmolalidade (5.2.28). No mínimo, 240 mosmol/kg.

pH (5.2.19). 6,5 a 7,5.

Solubilidade. Adicionar o volume do líquido diluente especificado no rótulo, observando a temperatura recomendada. Agitar suavemente por no máximo 10 minutos. A preparação dissolve-se completamente e observa-se a formação de uma solução que pode ser levemente corada.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Água. Determinar por um dos métodos a seguir: *Determinação da água pelo método semimicro (5.2.20.3)*, *Determinação da perda por dessecação (5.2.9)* ou *Espectrofotometria de absorção no infravermelho (5.2.14)*. O teor de água deve ser inferior a 2,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Pirogênicos (5.5.2.1). Cumpre o teste. Injetar em cada coelho, por quilograma de peso corporal, um volume da amostra reconstituída correspondente a, pelo menos, 30 UI de Fator IX.

DOSEAMENTO

Fator IX

Proceder conforme descrito em *Determinação do Fator IX da coagulação sanguínea humana (5.5.1.4)*. A atividade determinada não é inferior a 80% nem superior a 125% da atividade declarada. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada não é inferior a 80% e não ultrapassa 125%.

Fator II

Proceder conforme descrito em *Determinação do Fator II da coagulação sanguínea humana (5.5.1.3)*. A atividade determinada não é inferior a 80% nem superior a 125% da atividade declarada. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada está compreendido entre 90% e 111%.

Fator VII

Proceder conforme descrito em *Determinação do Fator VII da coagulação sanguínea humana (5.5.1.5)*. A atividade determinada não é inferior a 80% nem superior a 125% da atividade declarada. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada está compreendido entre 80% e 125%.

Fator X

Proceder conforme descrito em *Determinação do Fator X da coagulação sanguínea humana (5.5.1.6)*. A atividade determinada não é inferior a 80% nem superior a 125% da atividade declarada. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada está compreendido entre 90% e 111%.

Fatores da coagulação ativados

Proceder conforme descrito em *Determinação dos fatores da coagulação ativados (5.5.1.8)*. Se necessário, diluir a amostra para obter uma solução que contenha 20 UI de Fator IX por mililitro. Para cada uma das diluições, o tempo de coagulação não é inferior a 150 segundos.

Heparina

Caso se tenha adicionado heparina durante a preparação, determinar o seu teor de acordo com o método *Determinação da heparina nos fatores da coagulação (5.5.1.1)*. A amostra não contém mais que a quantidade de heparina indicada no rótulo e nunca contém mais de 0,5 UI de heparina por unidade internacional de Fator IX.

Proteínas totais

Se necessário, deve-se diluir a preparação reconstituída com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) de forma a obter-se uma solução que contenha cerca de 15 mg de proteínas em 2 mL. Em um tubo de centrifuga de fundo redondo, introduzir 2 mL dessa solução. Adicionar 2 mL de solução de molibdato de sódio a 75 g/L e 2 mL de uma mistura de ácido sulfúrico isento de nitrogênio e água (1:30). Agitar e centrifugar durante 5 minutos. O líquido sobrenadante deve ser decantado permitindo-se que o tubo seja enxuto sobre um papel de filtro. Determinar o nitrogênio no resíduo pelo método de *Determinação de nitrogênio (5.3.3.2)*. Calcular o teor em proteínas devendo ser o resultado multiplicado por 6,25.

Trombina

Caso a amostra contenha heparina, determinar o seu teor como indicado no ensaio biológico da heparina e neutralizá-la por adição de sulfato de protamina (10 µg de sulfato de protamina neutralizam 1 UI de heparina). Utilizar dois tubos de ensaio e, em cada um, misturar volumes iguais da amostra reconstituída de uma solução de fibrinogênio a 3 g/L. Manter um dos tubos a 37 °C durante 6 horas e o outro à temperatura ambiente durante 24 horas. Num terceiro tubo, misturar volumes iguais da solução de fibrinogênio e de solução de trombina humana a 1 UI/mL e colocar o tubo em banho-maria a 37 °C. Não se produz coagulação nos tubos que contêm a amostra. Produz-se coagulação dentro de 30 segundos no tubo que contém a trombina.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Ao abrigo da luz.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente. O rótulo deve declarar:

- a denominação: complexo protrombínico total;
- o número de Unidades Internacionais dos Fatores IX, VII e X e o número ou intervalo de Unidades Internacionais do Fator II por frasco;
- a quantidade de proteínas em cada recipiente;
- o nome e a quantidade de qualquer substância adicionada, compreendendo a heparina e trombina, se esse for o caso;
- o nome e o volume do diluente necessário para reconstituir a preparação.

DALTEPARINA SÓDICA**Dalteparinum natricum**

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

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

A massa molecular média relativa varia de 5600 Da a 6400 Da, com um valor característico de cerca de 6000 Da. O grau de sulfatação é de 2,0 a 2,5 sulfatos por

unidade dissacarídica. A potência da dalteparina sódica não deve ser inferior a 110 UI nem superior a 210 UI de atividade antifator Xa por miligrama, em relação à substância dessecada. A atividade do antifator IIa não deve ser inferior a 35 IU/mg nem superior a 100 UI/mg, em relação à substância dessecada. A razão da atividade antifator Xa pela atividade antifator IIa deve ser entre 1,9 e 3,2.

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

IDENTIFICAÇÃO

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

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

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

CARACTERÍSTICAS

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

ENSAIOS DE PUREZA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Injetar 100 µL cada uma das Soluções de referência (c) e (e). O teste só é válido se: o fator de correlação para uma relação linear entre a concentração e a resposta para as Soluções de referência (c), (d) e (e) for de pelo menos 0,995; a relação sinal-ruído para Solução de referência (c) não for inferior a 5 (se o nível de ruído é demasiado elevado, a recalibração do eletrodo é recomendada); uma injeção em branco de água purificada não der origem a picos espúrios.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

em que

$\text{Padrão}_1 = \text{Solução de referência (d)}$;

$\text{Padrão}_0 = \text{Solução de referência (c)}$;

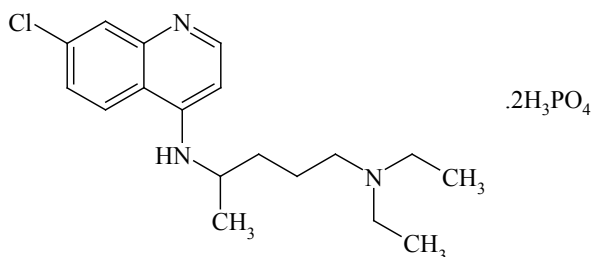
$\text{Padrão}_{\text{cal}} = \text{Solução de referência (b)}$;

$\text{Branco} = \text{Solução de referência (a)}$.

Perda por dessecação (5.2.9). Pesar cerca de 1 g da amostra. Dessecar a amostra a 60 °C sobre pentóxido de fósforo a uma pressão não superior a 670 Pa durante 3 h. No máximo 5%.

DIFOSFATO DE CLOROQUINA

Cloroquini diphosphas



$C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$, 515,87

difosfato de cloroquina; 02489

Bis(diidrogenofosfato) de N^4 -(7-cloro-4-quinolinil)- N^1, N^1 -dietil-1,4-pentanodiamina

[50-63-5]

Contém, no mínimo, 98,0% e, no máximo, 102,0% de $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$, em relação à substância dessecada.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó cristalino, branco ou quase branco, higroscópico. Apresenta polimorfismo.

Solubilidade. Facilmente solúvel em água, muito pouco solúvel em etanol e metanol, praticamente insolúvel em benzeno, clorofórmio e éter etílico.

Constantes físico-químicas.

Faixa de fusão (5.2.2): 193 °C a 195 °C, para um dos polimorfos e 215 °C a 218 °C para o outro polimorfo.

IDENTIFICAÇÃO

Os testes de identificação B. e C. podem ser omitidos se forem realizados os testes A. e D. O teste de identificação A. pode ser omitido se forem realizados os testes B., C. e D.

A. Dissolver 0,1 g da amostra em 10 mL de água em funil de separação. Adicionar 2 mL de hidróxido de sódio 2 M e extrair com duas porções de 20 mL de cloreto de metileno. Combinar os extratos orgânicos, lavar com água, secar com sulfato de sódio anidro e evaporar até secura. O espectro de absorção no infravermelho (5.2.14) do resíduo, dissolvido em 2 mL de cloreto de metileno, apresenta máximos de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades

relativas daqueles observados no espectro de difosfato de cloroquina SQR, preparado de maneira idêntica.

B. O espectro de absorção no ultravioleta (5.2.14), na faixa de 200 nm a 400 nm, da solução amostra obtida no método B. de *Doseamento*, exibe máximos e mínimos somente nos mesmos comprimentos de onda de solução similar de difosfato de cloroquina SQR. A razão entre os valores de absorvância medidos em 343 nm e 329 nm está compreendida entre 1,00 e 1,15.

C. Dissolver 25 mg da amostra em 20 mL de água e acrescentar 8 mL de ácido pícrico a 1% (p/v). Forma-se precipitado amarelo. Lavar o precipitado, sucessivamente, com água, etanol e cloreto de metileno. Deixar secar. O resíduo funde entre 206 °C e 209 °C.

D. Dissolver 0,1 g da amostra em 10 mL de água, acrescentar 2 mL de hidróxido de sódio 2 M e extrair com duas porções de 20 mL de cloreto de metileno. A camada aquosa, acidificada com ácido nítrico, responde à reação 2 do íon fosfato (5.3.1.1).

ENSAIOS DE PUREZA

pH (5.2.19). 3,8 a 4,3. Determinar em solução a 10% (p/v) em água isenta de dióxido de carbono.

Perda por dessecação (5.2.9). Determinar em 1 g da amostra, em estufa a 105 °C, por 16 horas. No máximo 2,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA.

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Proceder conforme descrito em *Titulações em meio não aquoso (5.3.3.5)*. Dissolver 0,2 g da amostra em 50 mL de ácido acético glacial. Titular com ácido perclórico 0,1 M SV determinando o ponto final potenciométricamente. Cada mL de ácido perclórico 0,1 M SV equivale a 25,794 mg de $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$.

B. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no ultravioleta (5.2.14)*. Pesar, exatamente, cerca de 0,1 g da amostra e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 5 mL de água e dissolver. Completar o volume com ácido clorídrico a 0,1% (p/v). Diluir, sucessivamente, em ácido clorídrico a 0,1% (p/v), até concentração de 0,001% (p/v). Preparar solução padrão na mesma concentração, utilizando o mesmo solvente. Medir as absorvâncias das soluções

resultantes em 343 nm, utilizando ácido clorídrico a 0,1% (p/v) para ajuste do zero. Calcular o teor de $C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2H_3PO_4$ na amostra a partir das leituras obtidas.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

ROTULAGEM

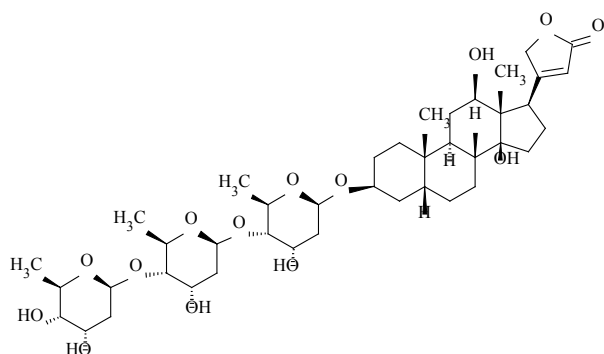
Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Antimalárico.

DIGOXINA

Digoxinum



$C_{41}H_{64}O_{14}$; 780,94

digoxina; 03010

(3 β ,5 β ,12 β)-3-[(O-2,6-Didesoxi- β -D-ribohexopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-2,6-didesoxi- β -D-ribohexopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,6-didesoxi- β -D-ribohexopiranosil)oxi]-12,14-diidroxicard-20(22)-enolídeo

[20830-75-5]

Contém, no mínimo, 95,0% e, no máximo, 103,0% de $C_{41}H_{64}O_{14}$, em relação à substância dessecada.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó ou cristais brancos ou quase brancos.

Solubilidade. Praticamente insolúvel em água, solúvel em mistura de clorofórmio e éter etílico, mistura de etanol e água, e em piridina, praticamente insolúvel em éter etílico, acetona, acetato de etila e clorofórmio.

Constantes físico-químicas.

Poder rotatório específico (5.2.8): +10,0° a +13,0°, em relação à substância dessecada. Determinar na solução a 2% (p/v) em piridina anidra.

IDENTIFICAÇÃO

O teste de identificação A. pode ser omitido se forem realizados os ensaios B. D. e E. O teste de identificação A. pode ser omitido se forem realizados os ensaios C. D. e E.

A. O espectro de absorção no infravermelho (5.2.14) da amostra dessecada em estufa a vácuo a 105 °C por 1 hora, e dispersa em brometo de potássio, apresenta máximos de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas daqueles observados no espectro de digoxina SQR, preparado de maneira idêntica.

B. A mancha principal do cromatograma da *Solução (1)*, obtida em *Substâncias relacionadas*, corresponde em posição, cor e intensidade àquela obtida com a *Solução (2)*.

C. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtida no método **B.** de *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Solução padrão*.

D. Dissolver aproximadamente 0,5 mg de amostra em 0,2 mL de etanol a 60% (v/v). Adicionar 0,1 mL de ácido 3,5-dinitrobenzóico a 2% (p/v) em etanol e 0,1 mL de hidróxido de sódio SR. Desenvolve-se coloração violeta.

E. Dissolver aproximadamente 0,5 mg da amostra em 1 mL de ácido acético glacial, aquecer suavemente, esperar esfriar e adicionar 0,05 mL de cloreto férrico SR. Adicionar 1 mL de ácido sulfúrico, evitando misturar as duas fases. Desenvolve-se anel marrom na interface, que deve mudar para verde. Logo após, a fase superior deve mudar para azul.

ENSAIOS DE PUREZA

Aspecto da solução. A solução a 0,5% (p/v) em mistura de metanol e cloreto de metileno (1:1) é límpida (5.2.25) e incolor (5.2.12).

Substâncias relacionadas. Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada (5.2.17.1)*, utilizando sílica-gel de fase reversa, quimicamente ligada a grupo octadecilsilano, como suporte, e mistura de metanol e água (7:3), como fase móvel. Aplicar,

separadamente, à placa, 10 µL de cada uma das soluções, recentemente preparadas, descritas a seguir.

Solução (1): solução a 10 mg/mL da amostra em mistura de clorofórmio e metanol (2:1).

Solução (2): solução a 10 mg/mL de digoxina SQR em mistura de clorofórmio e metanol (2:1).

Solução (3): solução a 0,3 mg/mL de gitoxina SQR em mistura de clorofórmio e metanol (2:1).

Desenvolver o cromatograma. Remover a placa, deixar secar ao ar. Nebulizar com ácido tricloroacético-cloramina-T SR. Aquecer em estufa a 110 °C por 10 minutos e examinar sob luz ultravioleta (365 nm). Qualquer mancha secundária obtida no cromatograma da *Solução (1)*, diferente da mancha principal, não é mais intensa que aquela obtida com a *Solução (3)* (3,0%).

Perda por dessecação (5.2.9). Determinar em 0,5 g da amostra, em estufa a vácuo a 105 °C por 1 hora. No máximo 1%.

Cinzas sulfatadas (5.2.10). Determinar na amostra submetida ao teste de *Perda por dessecação*. No máximo 0,1%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA.

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no ultravioleta (5.2.14)*. Pesar, exatamente, cerca de 40 mg da amostra e dissolver em etanol. Aquecer se necessário e completar o volume para 50 mL com o mesmo solvente. Diluir, sucessivamente, em etanol até concentração de 0,004% (p/v). Preparar solução padrão na mesma concentração, utilizando o mesmo solvente. A 5 mL de cada solução diluída adicionar 3 mL de picrato de sódio alcalino SR e deixar em repouso, por 30 minutos, ao abrigo da luz. Medir as absorvâncias das soluções amostra e padrão resultantes, em 495 nm, utilizando mistura de 5 mL de etanol e 3 mL de picrato de sódio alcalino SR para o ajuste do zero. Calcular o teor de $C_{41}H_{64}O_{14}$ na amostra a partir das leituras obtidas.

B. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 218 nm; coluna de 250 mm de comprimento e 4,2 mm de diâmetro interno empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano; fluxo da *Fase móvel* de 2,0 mL/minuto.

Fase móvel: mistura de água e acetonitrila (70:30).

Solução amostra: pesar, exatamente, cerca de 20 mg da amostra e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar 35 mL de mistura de etanol e água (1:1) e deixar em ultrassom por 30 minutos. Completar o volume e homogeneizar. Diluir, sucessivamente, com o mesmo solvente, de modo a obter solução a 40 µg/mL.

Solução padrão: pesar, exatamente, cerca de 20 mg de digoxina SQR e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar 35 mL de mistura de etanol e água (1:1) e deixar em ultrassom por 30 minutos. Completar o volume e homogeneizar. Diluir, sucessivamente, com o mesmo solvente, de modo a obter solução a 40 µg/mL.

A eficiência da coluna não deve ser menor do que 4800 pratos teóricos/metro. O fator de cauda do pico de digoxina não deve ser maior do que 2,0. O desvio padrão relativo das áreas de replicatas dos picos registrados não deve ser maior que 2,0%.

Procedimento: injetar, separadamente, 20 µL das *Solução padrão* e *Solução amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. Calcular o teor de $C_{41}H_{64}O_{14}$ na amostra a partir das respostas obtidas para a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados, protegidos da luz.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Glicosídeo cardiotônico.

DIGOXINA SOLUÇÃO ORAL

Contém, no mínimo, 90% e, no máximo, 105% da quantidade declarada de $C_{41}H_{64}O_{14}$.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada (5.2.17.1)*, utilizando placa de sílica-gel de fase reversa ligada a grupo octadecilsilano, com 0,25 mm de espessura, como suporte, e mistura de metanol e água (7:3), como fase móvel. Aplicar, separadamente, 10 µL das soluções preparadas como descrito a seguir.

Solução (1): transferir volume da solução oral equivalente a 0,5 mg de digoxina para funil de separação e adicionar 5 mL de água. Extrair com três porções de

10 mL de clorofórmio. Combinar os extratos orgânicos e evaporar até a secura em banho-maria com o auxílio de corrente de ar para a secagem. No caso de traços de água ou propilenoglicol remanescentes, secar a vácuo a 100 °C por 30 minutos. Dissolver o resíduo em 2 mL de mistura de clorofórmio e metanol (2:1).

Solução (2): dissolver quantidade exatamente pesada de digoxina SQR em mistura de metanol e água (7:3) e diluir com o mesmo solvente para obter solução a 0,25 mg/mL.

Desenvolver o cromatograma em percurso de 15 cm. Remover a placa, deixar secar ao ar por alguns minutos. Nebulizar com *ácido tricloroacético-cloramina-T* SR recém preparada. Aquecer em estufa a 110 °C por 10 minutos e examinar sob luz ultravioleta (365 nm). A mancha principal obtida com a *Solução (1)* corresponde em posição àquela obtida com a *Solução (2)*.

B. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtido em *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Solução padrão*.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

TESTE DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 218 nm; coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (3 µm a 10 µm), mantida a 40 °C; fluxo da *Fase móvel* de 0,5 mL/minuto.

Fase móvel: mistura de água, acetonitrila e álcool isopropílico (70:27,5:2,5).

Solução amostra: transferir exatamente 10 mL da solução oral, equivalente a 0,5 g de digoxina, para balão volumétrico de 25 mL. Completar o volume com etanol a 42% (p/p) e homogeneizar.

Solução padrão: dissolver quantidade exatamente pesada de digoxina SQR em etanol a 42% (p/p) e diluir com o mesmo solvente para obter uma solução a 20 µg/mL.

Injetar replicatas de 10 µL da *Solução padrão*. O fator de cauda não é maior que 2,0. O desvio padrão relativo das áreas de replicatas dos picos registrados não é maior que 2,0%.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 µL da *Solução padrão* e da *Solução amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos principais. Calcular a quantidade de C₄₁H₆₄O₁₄ na solução oral a partir das respostas obtidas com a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados, protegidos da luz.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

ENOXAPARINA SÓDICA

Enoxaparinum natricum

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

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

A massa molecular média relativa varia de 3800 Da a 5000 Da, com um valor característico de cerca de 4500 Da. O grau de sulfatação é cerca de dois sulfatos por unidade dissacarídica. A potência não deve ser inferior a 90 UI nem superior a 125 UI de atividade antifator Xa por miligrama, calculado em relação à substância dessecada. A atividade antifator IIa não deve ser inferior a 20,0 UI nem superior a 35,0 UI por miligrama, calculada em relação à substância dessecada. A razão da atividade antifator Xa pela atividade antifator IIa deve estar entre 3,3 e 5,3.

A enoxaparina é produzida por despolimerização alcalina do benzil éster da heparina de mucosa intestinal suína, em condições que resultam em um produto que

esteja em conformidade com os requisitos estruturais descritos anteriormente.

IDENTIFICAÇÃO

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

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

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

CARACTERÍSTICAS

Aspecto da solução. A solução é límpida (5.2.25).

ENSAIOS DE PUREZA

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

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

Conteúdo de álcool benzílico. No máximo 0,1% (m/m). Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência* (5.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 256 nm; pré-coluna de 20 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (5 µm); coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (5 µm), mantida à temperatura de 40 °C, fluxo da *Fase móvel* de 1 mL/minuto.

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

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

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

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

em que

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

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

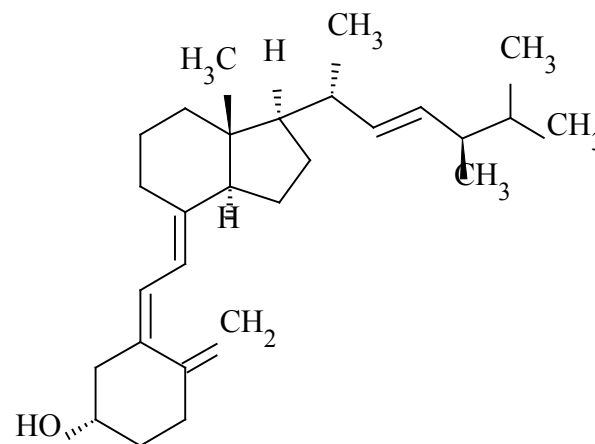
C_r = concentração de álcool benzílico na *Solução de referência* (mg/mL);

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

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

ERGOCALCIFEROL

Ergocalciferolum



$C_{28}H_{44}O$; 396,65

ergocalciferol; 03477

(1*S*,3*Z*)-4-Metileno-3-[(2*E*)-2-[(1*R*,3*aS*,7*aR*)-octaidro-7*a*-metil-1-[(1*R*,2*E*,4*R*)-1,4,5-trimetil-2-hexen-1-il]-4*H*-inden-4-ilideno]etilideno]cicloexanol

[50-14-6]

Contém, no mínimo, 97,0% e, no máximo, 103,0% de $C_{28}H_{44}O$.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó branco a branco-amarelado.

Solubilidade. Praticamente insolúvel em água e solúvel em etanol e óleos graxos.

Constantes físico-químicas.

Faixa de fusão (5.2.2): 115 °C a 119 °C.

Poder rotatório específico (5.2.8): +103° a +106°. Determinar em solução a 1,5% (p/v) em etanol. Fazer a leitura dentro de 30 minutos após a solução ter sido preparada.

IDENTIFICAÇÃO

Nota: proceder às análises ao abrigo da luz direta e empregar vidraria âmbar.

Os testes de identificação B, C e D, podem ser omitidos se for realizado o ensaio A.

A. O espectro de absorção no infravermelho (5.2.14) da amostra dispersa em brometo de potássio apresenta máximos de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas daqueles observados no espectro de ergocalciferol SQR, preparado de maneira idêntica.

B. O espectro de absorção no ultravioleta (5.2.14), na faixa de 200 nm a 400 nm, de solução a 0,001% (p/v) em etanol, exibe máximo em 265 nm, idênticos ao observado no espectro de solução similar de ergocalciferol SQR.

C. Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada (5.2.17.1)*, utilizando sílica- gel G, como suporte, e mistura de cicloexano e éter etílico (1:1), como fase móvel. Aplicar separadamente, à placa 10 µL de cada uma das soluções, recentemente preparadas, descritas a seguir. Proceder a análise ao abrigo da luz.

Solução (1): preparar uma solução de esqualano (1:100) em clorofórmio, contendo 50 mg da amostra por mL.

Solução (2): preparar uma solução de esqualano (1:100) em clorofórmio, contendo 50 mg de ergocalciferol SQR por mL.

Solução (3): preparar uma solução de esqualano (1:100) em clorofórmio, contendo 100 µg de ergosterol por mL.

Desenvolver o cromatograma. Remover a placa, deixar secar ao ar. Nebulizar a placa com solução 1:50 de cloreto de acetila em cloreto de antimônio SR. A mancha principal obtida com a *Solução (1)* corresponde em posição, cor e intensidade àquela obtida com a *Solução (2)*, podendo apresentar uma mancha violeta abaixo da mancha do ergocalciferol. A coloração da mancha violeta é menos intensa que aquela do cromatograma obtida com solução de ergosterol.

D. Dissolver 5 mg da amostra em 5 mL de clorofórmio e adicionar 0,3 mL de anidrido acético e 0,1 mL de ácido sulfúrico. Agitar vigorosamente. Desenvolve-se

coloração vermelho-brilhante que, rapidamente, passa a violeta, e depois a azul e finalmente a verde.

ENSAIOS DE PUREZA

Substâncias redutoras. Dissolver 0,1 g de amostra em etanol e completar o volume para 10 mL com o mesmo solvente. Adicionar 0,5 mL de solução de azul de tetrazólio (1:200) em etanol e 0,5 mL de hidróxido de tetrametilamônio a 10% (v/v) em etanol. Deixar a mistura em repouso por 5 minutos e em seguida adicionar 1 mL de ácido acético glacial. Realizar ensaio em branco utilizando 10 mL de etanol. Determinar a absorbância da solução em 525 nm. A absorvância é menor que aquela obtida com uma solução contendo 0,2 g de hidroquinona por mL de etanol, preparada da mesma maneira.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA.

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 254 nm; coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica (5 µm), mantida a temperatura ambiente; fluxo da *Fase móvel* de 2 mL/minuto.

Fase móvel: álcool *n*-amílico e hexano (3:997).

Solução amostra: transferir 10 mg da amostra, exatamente pesada, para balão volumétrico de 100 mL, dissolver em 10 mL de tolueno e completar o volume com *Fase móvel*.

Solução padrão: dissolver quantidade, exatamente pesada, de ergocalciferol SQR em 10 mL de tolueno e completar o volume com *Fase móvel* de modo a obter solução a 100 µg/mL.

Solução de resolução: dissolver 1 mg de colecalciferol em 5 mL de *Fase móvel*. Aquecer em banho-maria, com refluxo, a 90 °C durante 45 minutos e deixar esfriar.

Injetar replicatas de 20 µL da *Solução de resolução*. Os tempos de retenção relativos em relação ao colecalciferol são: 0,4 para o pré-colecalciferol e 0,5 para o *trans*-colecalciferol. A resolução entre pré-colecalciferol e *trans*-colecalciferol não é menor que 1,0. Se necessário ajustar a proporção da *Fase móvel* e o fluxo para obtenção desta resolução. O desvio padrão relativo das áreas de replicatas dos picos de colecalciferol não é maior que 1,0 %.

Procedimento: injetar, separadamente, 20 µL da *Solução padrão* e a *Solução amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular o teor de $C_{28}H_{44}O$ na amostra a partir das respostas obtidas com a *Solução padrão* e com a *Solução amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados, protegidos da luz.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Vitamina.

1:50 de cloreto de acetila em cloreto de antimônio SR.

Preparar solução 1:50 de cloreto de acetila em cloreto de antimônio SR a ser utilizada na nebulização da placa conforme descrito a seguir.

Solução A: 110 g cloreto de antimônio em 400 mL de 1,2-diclorometano. Adicionar 2 g de óxido de alumínio anidro, misturar e filtrar através de filtro de vidro sinterizado em balão volumétrico de 500 mL. Diluir a 500 mL com 1,2-diclorometano e misturar. A absorbância da solução resultante medida a 500 nm em célula de 2 cm não é maior que 0,07 utilizando 1,2-diclorometano como branco.

Solução B: em capela, misturar 100 mL de cloreto de acetila destilado, incolor, e 400 mL de 1,2-diclorometano e conservar sob refrigeração.

Misturar 90 mL da *Solução A* e 10 mL da *Solução B*. Armazenar em frascos âmbar, de boca esmerilhada, e usar dentro de 7 dias. Descartar se houver aparecimento de cor.

ESTEARATO DE ZINCO

Zinci stearas

$(C_{17}H_{35}CO_2)_2Zn$; 632,34

estearato de zinco; 10665

[557-05-1]

Contém, no mínimo, 10,0% e, no máximo, 12,0% de Zn.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó branco, amorfo, leve, isento de partículas grumosas.

Solubilidade. Praticamente insolúvel em água, etanol e éter etílico.

Constantes físico-químicas.

Temperatura de solidificação (5.2.29.3): no mínimo 54 °C. Determinar no resíduo obtido no preparo da *Solução (1)*, descrita em *Aspecto da solução*.

IDENTIFICAÇÃO

Responde às reações do íon zinco (5.3.1.1). Determinar em 1 mL da *Solução (1)*, obtida em *Aspecto da solução*.

ENSAIOS DE PUREZA

Aspecto da solução. Preparar a *Solução (1)* como descrito a seguir. A *Solução (1)* não é mais corada que a *Solução padrão de cor SC F (5.2.12)*.

Solução (1): dissolver 5 g da amostra em 50 mL de éter etílico e 40 mL de ácido nítrico 7,5% (v/v). Aquecer sob refluxo até completa dissolução e, em seguida, deixar esfriar. Separar a fase aquosa e agitar a fase etérea com 4 mL de água, repetir esse procedimento. Reunir as fases aquosas, lavar com 15 mL de éter etílico e completar o volume para 50 mL com água. Evaporar a fase etérea e levar o resíduo à secura em estufa a 105 °C. O resíduo obtido será utilizado no teste de *Temperatura de solidificação*, *Aspecto da solução de ácidos graxos* e Índice de acidez.

Aspecto da solução de ácidos graxos. Dissolver 0,5 g do resíduo obtido no preparo da *Solução (1)* em 10 mL de clorofórmio. A solução não é mais corada que a solução a 12,5% (v/v) de *Solução base de cloreto férrico (5.2.12)* em 100 mL de HCl 1%.

Acidez e Alcalinidade. Aquecer à ebulição por 1 minuto, exatamente, 1 g de amostra dissolvida em 5 mL de etanol e 20 mL de água. Deixar esfriar e filtrar. No máximo, 0,3 mL de hidróxido de sódio 0,1 M é gasto para neutralizar 10 mL do filtrado, utilizando vermelho de fenol SI como indicador. No máximo, 0,3 mL de ácido clorídrico 0,1 M

é gasto para neutralizar 10 mL do filtrado, utilizando o mesmo indicador.

Índice de acidez (5.2.29.7). 195 a 210. Determinar em 0,2 g do resíduo obtido no preparo da *Solução (I)* em *Aspecto da solução*.

Cádmio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Utilizar o *Método II*. Utilizar espectrofotômetro provido de chama alimentada com mistura de ar-acetileno, lâmpada de cátodo oco de cádmio e selecionar a linha de emissão em 228,8 nm.

Solução amostra: dissolver 20 mL da *Solução (I)*, obtida em *Aspecto da solução* em 50 mL de solução a 3,5% (v/v) de ácido nítrico em água. No máximo 5 ppm de cádmio.

Solução padrão: preparar as soluções de referência utilizando uma solução estoque de 1000 ppm de cádmio. As diluições devem ser feitas em ácido nítrico 3,5% (v/v).

Chumbo. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Utilizar o *Método II*. Utilizar espectrofotômetro provido de chama alimentada com mistura de ar-acetileno, lâmpada de cátodo oco de chumbo e selecionar a linha de emissão em 283,3 nm.

Solução amostra: utilizar a *Solução (I)*, obtida em *Aspecto da solução*. No máximo 25 ppm de chumbo.

Solução padrão: preparar as soluções de referência utilizando uma solução estoque de 1000 ppm de chumbo. As diluições devem ser feitas em ácido nítrico 3,5% (v/v).

Cloretos (5.3.2.1). Com alíquota de 14 mL da *Solução (I)*, obtida em *Aspecto da solução*, proceder conforme descrito em *Ensaio limite para cloretos*, utilizando 1 mL de ácido clorídrico 0,01 M para a *Preparação padrão*. No máximo 0,025% (250 ppm).

Sulfatos (5.3.2.2). Com alíquota de 2 mL da *Solução (I)*, obtida em *Aspecto da solução*, proceder conforme descrito em *Ensaio limite para sulfatos*, utilizando 2,5 mL de ácido sulfúrico 0,005 M para a *Preparação padrão*. No máximo 0,6% (6000 ppm)

Perda por dessecação (5.2.9). Determinar em 1 g da amostra após dessecarem estufa a temperatura entre 100 °C e 105 °C, até peso constante. No máximo, 6,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Bactérias aeróbicas totais: no máximo 1000 UFC/g. Fungos e leveduras: no máximo 50 UFC/g.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Pesar, exatamente, cerca de 1 g da amostra e dissolver em 50 mL de ácido sulfúrico 0,05 M. Ferver essa solução por 10 minutos ou até ocorrer a formação de uma camada límpida de ácidos graxos, adicionando água, se necessário, para manter o volume original da solução. Resfriar e filtrar. Lavar cuidadosamente o filtro e o frasco com água até que a última lavagem não seja ácida ao papel de tornassol. Reunir as águas de lavagem ao filtrado. Proceder conforme *Titulações complexométricas (5.3.3.4)* para *Zinco*. Cada mL de EDTA dissódico 0,05 M SV equivale a 3,268 mg de Zn.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

ROTULAGEM

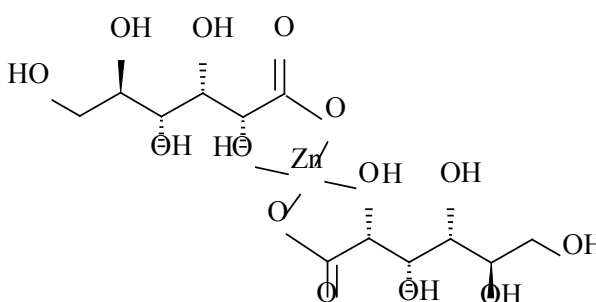
Observar a legislação vigente.

CATEGORIA

Adjuvante farmacotécnico.

GLICONATO DE ZINCO

Zinci gluconas



$C_{12}H_{22}O_{14}Zn$; 455,70

gliconato de zinco; 09453

(T-4)-Bis(D-gliconato- $\kappa O^1, \kappa O^2$)-zinco

[4468-02-4]

Contém, no mínimo, 97,0% e, no máximo, 102,0% de $C_{12}H_{22}O_{14}Zn$, em relação à base anidra.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó branco ou quase branco, cristalino ou granuloso.

Solubilidade. Facilmente solúvel em água e muito pouco solúvel em etanol.

IDENTIFICAÇÃO

Responde às reações do íon zinco (5.3.1.1). Utilizar teste 1 e teste 2.

ENSAIOS DE PUREZA

pH (5.2.19). 5,5 a 7,5. Determinar em solução aquosa a 1% (p/v).

Substâncias redutoras. Pesar 1 g da amostra em erlenmeyer de 250 mL, dissolver em 10 mL de água e adicionar 25 mL de citrato cúprico alcalino SR. Tampar o erlenmeyer, ferver suavemente por 5 minutos e resfriar rapidamente à temperatura ambiente. Adicionar 25 mL de ácido acético 6 M, 10 mL de iodo 0,1 M SV e 10 mL de ácido clorídrico 3 M. Titular com tiosulfato de sódio 0,1 M SV, adicionando 3 mL de amido SR próximo ao ponto final. Realizar ensaio em branco e fazer as correções necessárias. Cada mL de tiosulfato de sódio 0,1 M SV equivale a 2,7 mg de substâncias redutoras (expressas como dextrose). No máximo 1,0%.

Impurezas orgânicas voláteis. Proceder conforme descrito em Cromatografia a gás (5.2.17.5). Utilizar cromatógrafo provido de detector de ionização de chamas, utilizando mistura de nitrogênio, ar sintético e hidrogênio (1:1:10) como gases auxiliares à chama do detector; coluna capilar de 30 m de comprimento e 0,53 mm de diâmetro interno, preenchida com fase estacionária ligada a 5% de fenilpolisiloxano e 95% a metilpolisiloxano, com espessura do filme de 5 µm; temperatura da coluna de 35 °C a 260 °C (35 °C mantida durante 5 minutos, aumentada a 175 °C a 8 °C por minuto, aumentada a 260 °C a 35 °C por minuto e mantida a esta temperatura por pelo menos 16 minutos), temperatura do injetor a 70 °C e temperatura do detector a 260 °C; utilizar hélio como gás de arraste; fluxo do gás de arraste de 1,0 mL/minuto.

Solução amostra: pesar, exatamente, cerca de 1 g de amostra e dissolver em 50 mL de água, livre de compostos orgânicos.

Solução padrão: preparar uma solução, em água livre de compostos orgânicos, contendo em cada mL, 10 µg de cloreto de metileno, 1 µg de clorofórmio, 2 µg de benzeno, 2 µg de dioxana e 2 µg de tricloroetileno.

Procedimento: injetar, separadamente, 1 µL da Solução amostra e da Solução padrão no cromatógrafo a gás.

Obter os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. Identificar, baseado no tempo de retenção, qualquer pico presente no cromatograma da Solução amostra. A presença e a identificação dos picos no cromatograma devem ser estabelecidas comparando os cromatogramas da Solução amostra e da Solução padrão. Limites: benzeno 2 ppm, clorofórmio 50 ppm, dioxana 100 ppm, cloreto de metileno 500 ppm e tricloroetileno 80 ppm.

Cádmio. Proceder conforme descrito em Espectrofotometria de absorção atômica (5.2.13.2). Utilizar o Método II. Utilizar espectrofotômetro provido de chama alimentada com mistura de ar-acetileno, lâmpada de cátodo oco de cádmio e selecionar a linha de emissão em 228,8 nm.

Solução padrão: transferir 137,2 mg de nitrato de cádmio para balão volumétrico de 1000 mL, dissolver com água e completar o volume com o mesmo solvente. Homogeneizar. Transferir 25 mL da solução anterior e 1 mL de ácido clorídrico para balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com água e homogeneizar. A Solução padrão contém 12,5 µg/mL de cádmio.

Solução amostra: dissolver 10 g da amostra em 50 mL de água. No máximo 5 ppm de cádmio.

Procedimento: em três balões volumétricos de 25 mL separados, adicionar 0 mL, 2 mL e 4 mL da Solução padrão. Para cada balão adicionar 5 mL da Solução amostra, completar com água e misturar. Estas soluções contêm, respectivamente, 0 µg/mL; 1 µg/mL e 2 µg/mL de cádmio da Solução padrão. Plotar os valores da absorvância da Solução amostra versus concentração de cádmio, em µg/mL, conforme provida pelas Soluções padrão, estabelecer a reta que melhor se ajuste aos três pontos e extrapolar a reta até interceptar o eixo da concentração. A partir do intercepto determinar a quantidade, em µg, de cádmio em cada mL da Solução amostra contendo 0 mL da Solução padrão. Preparar branco em paralelo utilizando água. Calcular a quantidade, em ppm, de cádmio a partir das leituras obtidas.

Chumbo. Proceder conforme descrito em Espectrofotometria de absorção atômica (5.2.13.2). Utilizar o Método I. Utilizar espectrofotômetro provido de chama alimentada com mistura de ar-acetileno, lâmpada de cátodo oco de chumbo e selecionar a linha de emissão em 283,3 nm. No máximo 0,001% (10 ppm).

Solução de ácido ascórbico-iodeto de sódio: em um balão volumétrico de 200 mL, dissolver 20 g de ácido ascórbico e 38,5 g de iodeto de sódio em água. Completar o volume com o mesmo diluente e homogeneizar.

Solução de óxido de trioctilfosfina: em um balão volumétrico de 100 mL, dissolver 5 g de óxido de trioctilfosfina em metilisobutilcetona. Completar com o mesmo diluente e homogeneizar. Cuidado! Essa solução pode causar irritação nos olhos e na pele!

Solução padrão: transferir 5 mL de Solução estoque de nitrato de chumbo (5.3.2.3) para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água. Em um balão volumétrico de 50 mL, transferir 2 mL da solução anterior, 10 mL de ácido clorídrico 9 M, 20 mL da Solução de ácido ascórbico-iodeto de sódio e 5 mL de Solução de óxido de trioctilfosfina. Agitar durante 30 segundos e deixar em repouso para separar as fases. Completar o volume com água para trazer a fase orgânica para a parte superior do frasco, deixar separar as fases e proceder a separação. A fase orgânica é a que contém a Solução padrão (2,0 µg/mL).

Solução amostra: em um frasco de 50 mL, adicionar 1 g de gliconato de zinco, 10 mL de ácido clorídrico, aproximadamente 10 mL de água, 20 mL de Solução de ácido ascórbico-iodeto de sódio e 5 mL de Solução de óxido de trioctilfosfina. Agitar durante 30 segundos e deixar separar as fases. Adicionar água para trazer a fase orgânica para a parte superior do frasco. Agitar novamente e proceder à separação. A fase orgânica é a que contém a amostra a ser analisada.

Solução branco: em um balão volumétrico de 50 mL, adicionar 10 mL de ácido clorídrico 9 M, 20 mL da Solução de ácido ascórbico-iodeto de sódio e 5 mL de Solução de óxido de trioctilfosfina. Agitar durante 30 segundos e deixar em repouso para separar as fases. Completar o volume com água para trazer a fase orgânica para a parte superior do frasco, deixar separar as fases e proceder a separação. A fase orgânica é a que contém o branco (0,0 µg/mL).

Procedimento: medir as absorvâncias da Solução padrão, da Solução amostra e da Solução branco para o ajuste do zero. Calcular a quantidade, em ppm, de chumbo a partir das leituras obtidas.

Arsênio (5.3.2.5). Utilizar o Método I. Pesar 1 g de amostra e proceder conforme descrito em Ensaio limite para arsênio. No máximo 0,0003% (3 ppm).

Cloretos (5.3.2.1). Dissolver 0,7 g da amostra em 40 mL de água fervente e prosseguir conforme descrito em Ensaio limite para cloretos. No máximo 0,05% (500 ppm).

Sulfatos (5.3.2.2). Dissolver 2,4 g da amostra em 40 mL de água fervente e prosseguir conforme descrito em Ensaio limite para sulfatos. No máximo 0,05% (500 ppm).

Água (5.2.20.1). Utilizar Método indireto. No máximo 11,6%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA.

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Pesar, exatamente, cerca de 0,7 g da amostra e dissolver em 100 mL de água. Adicionar cerca de 5 mL de tampão cloreto de amônio pH 10,7 e 0,1 mL de negro de eriocromo T SI e titular com edetato dissódico 0,05 M SV. Titular até formação de coloração azul, correspondente ao ponto final da titulação. Cada mL de edetato dissódico 0,05 M SV equivale a 22,785 mg de $C_{12}H_{22}O_{14}Zn$.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados, protegidos da luz.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Suplemento alimentar.

HEPARINA CÁLCICA SOLUÇÃO INJETÁVEL

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

CARACTERÍSTICAS

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

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

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo 0,03 UE/UI de heparina.

DOSEAMENTO

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

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

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

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR

Heparinum massae molecularis minoris

As heparinas de baixo peso molecular são preparações que contêm uma mistura de cadeias polissacarídicas de peso molecular variado. Por definição, as heparinas de baixo peso molecular devem apresentar peso molecular médio menor que 8000 Da e, para isso, é necessário que no mínimo 60% da massa total apresente peso molecular menor que 8000 Da. São obtidas através do fracionamento ou despolimerização da heparina suína. As heparinas de baixo peso molecular apresentam diferenças estruturais químicas nos terminais redutores ou não redutores da cadeia polissacarídica decorrentes do método de fracionamento utilizado. A atividade anticoagulante decorre da inibição de diversos fatores da cascata de coagulação, prolongando o tempo de coagulação do sangue. Isso ocorre principalmente através da potencialização da inativação do fator Xa. A potência anticoagulante não é menor que 80, nem maior que 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. Cumpra 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 não menos que 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 trimetilsililpropionico de sódio.

Solução amostra: preparar solução em concentração de não menos que 20 mg/mL da amostra em óxido de deutério 99,9% com 0,02% (p/v) de ácido trimetilsililpropionico de sódio.

Procedimento: na análise das amostras deve-se utilizar um espectrômetro de ressonância magnética nuclear de não menos que 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 trimetilsililpropionico 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 em $2,16 \pm 0,03$ ppm, correspondente às regiões *N*-acetil.

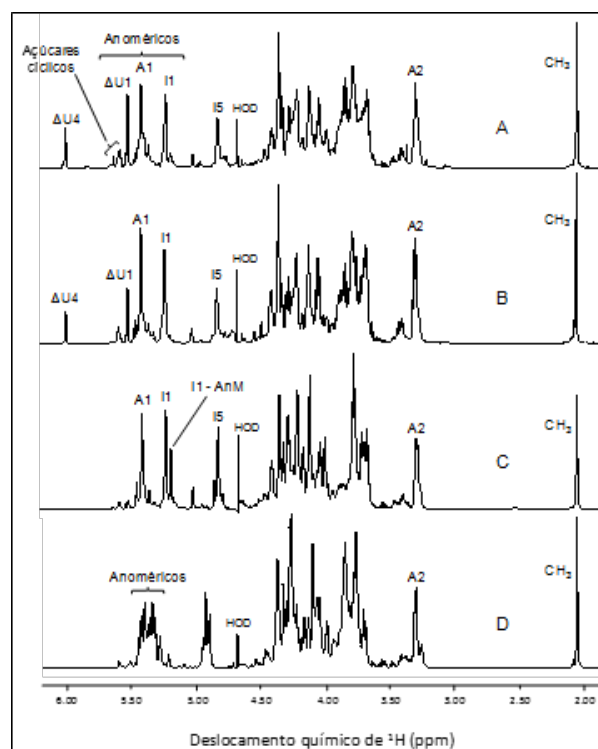


Figura 1 - Espectros de RMN 1D de ^1H de quatro tipos diferentes de heparina de baixo peso molecular.

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; DU1 e DU4 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/min.

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 use 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 (ΣUV₂₃₄) e sob a curva de RI (ΣRI) através de integração numérica da área de interesse (excluindo picos de sal e solventes no final do cromatograma). Calcule 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 não devem ser maiores que 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.

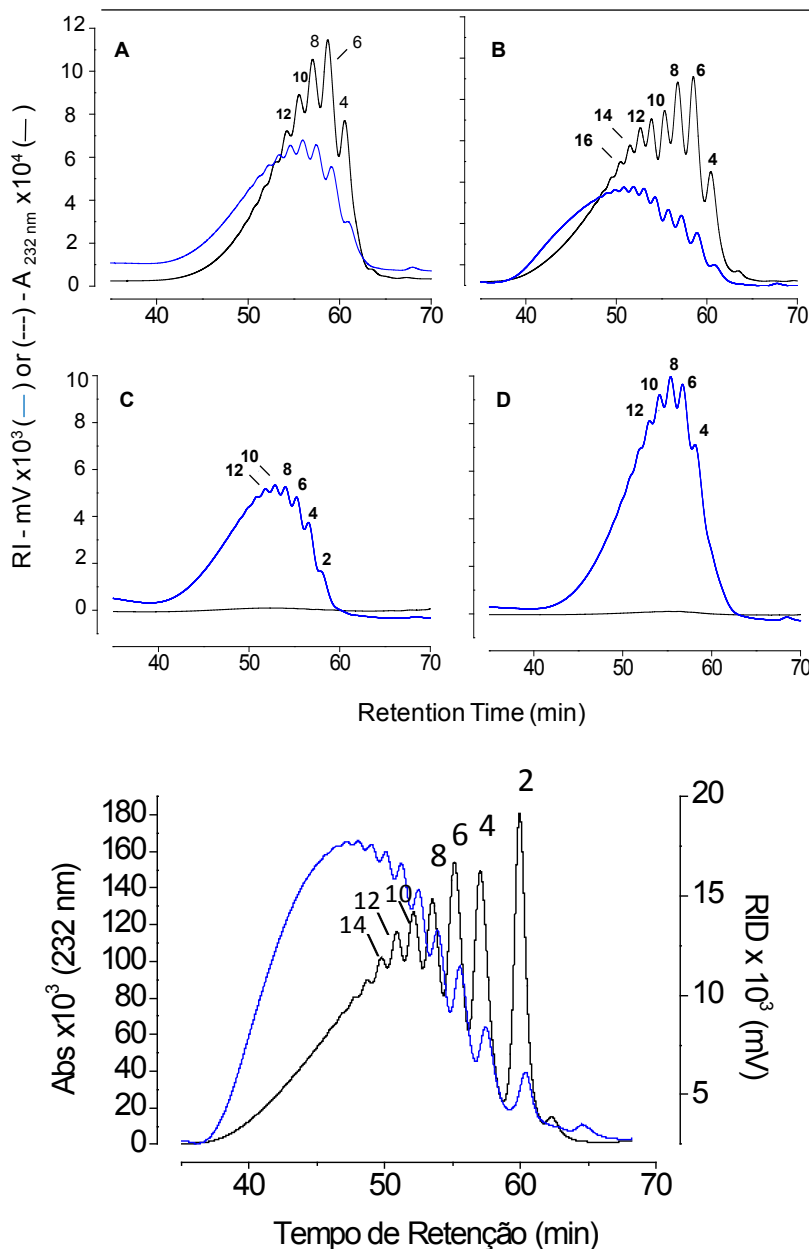


Figura 2 – Perfil de eluição das diferentes heparinas de baixo peso molecular pelo método de cromatografia de gel filtração.

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).

ÍSTICAS

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 5 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 não deve ser superior a 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). No máximo 10%, determinado a partir de 1000 g em estufa a vácuo a 60 °C, por 3 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 -benziloxycarbonil-D-arginil-L-glicil-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.

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 5 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 "enpoint": proceder como descrito na *Medição cinética*. Após a adição do substrato cromogênico, esperar 4 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/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/minuto contra as concentrações das *Soluções amostra* e das *Soluções padrões* e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de relação entre inclinação das retas. Expressar a potência da heparina de baixo peso molecular em UI/mg, de base seca.

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

Atividade anti-fator 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 -benziloxicarbonil-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.

HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR SOLUÇÃO INJETÁVEL

As preparações injetáveis de heparina de baixo peso molecular são soluções estéreis de heparina de baixo peso molecular diluída em água para injeção. A potência anticoagulante não é menor que 90%, nem maior que 110% do que a potência anti Xa declarada no rótulo em unidades por mililitro. A razão da atividade antifator Xa/antifator IIa deve ser observada de acordo com o tipo de

solução de heparina de baixo peso molecular analisada. A enoxaparina apresenta uma faixa de variação da razão atividade antifator Xa/antifator IIa entre 3,3 e 5,3. Para a tinzaparina a razão varia entre 1,5 e 2,5. A dalteparina apresenta razão entre 1,9 e 3,2 e a nadroparina entre 2,5 e 4,0.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

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

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo 0,01 UE/UI de heparina de baixo peso molecular.

DOSEAMENTO**Atividade antifator Xa.**

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4: dissolver quantidades de tris (hidroximetil) aminometano para obter concentração de 20 mM, cloreto de sódio para 150 mM e cloreto de cálcio para 10 mM em água destilada contendo 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 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.

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

Solução padrão: utilizar solução padrão de heparina de baixo peso molecular. Pode ser utilizada outra preparação, cuja potência tenha sido determinada

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

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

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

Medição cinética: os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo constante a relação entre os volumes. Executar o teste em microplacas e realizar a leitura espectrofotométrica a 405 nm em um leitor de microplacas a 37 °C. O ensaio deve ser realizado com cada *Solução padrão* e *Solução amostra* em duplicata. Em cada poço da microplaca, adicionar 40 µL de *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* ou da solução amostra, 25 µL da *Solução de antitrombina humana* e 10 µL da *Solução de fator Xa humano*. Após dois minutos de incubação a 37°C, adicionar 25 µL da *Solução de substrato cromogênico para fator Xa*. Registrar a absorbância medida em 405 nm contra o branco durante 5 minutos. O branco é o teste realizado na ausência da adição de heparina de baixo peso molecular, utilizando 40 µL de *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*.

Medição "endpoint": proceder como descrito na *Medição cinética*. Após a adição do substrato cromogênico, esperar 4 minutos e parar a reação com a adição de 50 µL de *Solução de parada*.

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

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

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

retas. Expressar a potência de heparina de baixo peso molecular em UI/ml.

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

Atividade antifator IIa

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

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

Solução de substrato cromogênico para fator IIa: dissolver quantidade de H-D-fenilalanina-L-arginina-p-nitroanilina 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*.

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

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Observar a legislação vigente.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

HEPARINA SÓDICA SOLUÇÃO INJETÁVEL

A preparação injetável de heparina sódica é uma solução estéril de heparina sódica diluída em água para injeção. A potência anticoagulante não é menor que 90,0%, nem maior que 110,0% do que a potência declarada no rótulo em unidades por mililitro.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

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

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo 0,03 UE/UI de heparina.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Método I

Atividade antifator IIa

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4: dissolver quantidades de tris (hidroximetil) aminometano para obter concentração de 20 mM, cloreto de sódio para 150 mM em água destilada contendo 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 mM. Antes do uso, diluir em *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* de modo a obter a solução 0,4 mM. Proceder ao abrigo de luz direta.

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

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

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

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

Medição cinética: os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo as proporções entre as preparações de padrão, amostra em teste e reagentes. Executar o teste em microplacas e realizar a leitura espectrofotométrica a 405 nm em um leitor de microplacas a 37 °C. O ensaio deve ser realizado com cada solução de heparina SQR e solução amostra em duplicata. Em cada poço da microplaca, adicionar 40 µL de *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* ou da solução amostra, 25 µL da *Solução de antitrombina humana* e 10 µL da *Solução de fator IIa humano*. Após dois minutos de incubação a 37 °C, adicionar 25 µL da *Solução de substrato cromogênico para fator IIa humano*. Registrar a absorvância medida em 405 nm contra o branco durante 5 minutos. O branco é o teste realizado na ausência da adição de heparina, utilizando 40 µL de *tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4*.

Medição "endpoint": proceder como descrito na *Medição cinética*. Após a adição do substrato cromogênico, esperar 4 minutos e parar a reação com a adição de 50 µL de *Solução de parada*.

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

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

Relação entre Inclinação das Retas: para cada série, calcular a regressão da absorvância em logaritmo ou o

logaritmo das alterações na absorção/minuto contra as concentrações das soluções de amostra e das soluções de padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de relação entre inclinação das retas. Expressar a potência da heparina sódica em UI/ml.

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

B. Método II

Atividade antifator IIa

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4: dissolver 6,10 g de tris (hidroximetil) aminometano, 10,20 g de cloreto de sódio, 2,80 g edetato de sódio e, se necessário, 0 a 10,0 g de 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 1 000 mL.

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

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

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

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

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

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

Procedimento: os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo as proporções entre as preparações de padrão, amostra em teste e reagentes. O ensaio deve ser realizado com cada solução de heparina e solução amostra em duplicata. Os tubos devem ser identificados de acordo

com o número de replicatas a serem testadas. Distribuir os brancos nas colunas de forma que representem o comportamento dos reagentes durante o ensaio. O branco é o teste realizado na ausência da adição de heparina, utilizando 50 a 100 µL de *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*.

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

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

Medição cinética: registrar a mudança na absorvância para cada solução durante 1 minuto, medida em 405 nm. Expressar como mudança na absorção por minuto ($\Delta OD/min$) das soluções e dos brancos, os quais devem apresentar valores superiores devido à ausência de heparina. O desvio padrão relativo entre as leituras obtidas com o branco deve ser menos que 10%.

Medição "endpoint": parar a reação após 1 minuto com 50 a 100 µL de *Solução de parada*. Registrar a absorvância de cada solução a 405 nm. O desvio padrão relativo entre as leituras obtidas com o branco deve ser menos que 10%.

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

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

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

Critérios de aceitação: a potência das preparações injetáveis de heparina sódica deve apresentar no mínimo

90%, e no máximo, 110% da atividade declarada pelo rótulo. A potência deve ser expressa em UI/mL.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Observar a legislação vigente.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Anticoagulante.

HEPARINA SÓDICA SUÍNA

A heparina sódica suína é extraída de mucosa intestinal suína e contém uma mistura de cadeias polissacarídicas de peso molecular variado. É composta, preponderantemente, por unidades alternadas de α -D-glucosamina *N*- e 6- disulfatadas e ácido α -idurônico 2-sulfatado. Possui atividade anticoagulante devido à inibição de diversos fatores do sistema de coagulação, prolongando o tempo de coagulação do sangue. Isso ocorre principalmente por meio da potencialização da inativação do fator Xa e da trombina pela antitrombina. Contém, no mínimo, 180 unidades de atividade antifator IIa por mg de heparina, em relação à substância dessecada. A razão da atividade antifator Xa pela atividade antifator IIa deve ser $1,0 \pm 0,1$. 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. Cumpra 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 suína (SQR) em óxido de deutério 99,9% com 0,02% (p/v) de ácido trimetilsililpropiónico de sódio.

Solução para adequação do sistema: preparar solução a 1% (p/p) de condroitim 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 s, tempo de repetição (tempo de espera mais tempo de aquisição) mínimo de 4s. 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 condroitim sulfato supersulfatado na *Solução para a adequação do sistema* devem ser observados em $2,05 \pm 0,03$ ppm e $2,16 \pm 0,03$ ppm, respectivamente. Os deslocamentos químicos dos sinais correspondentes ao H1 e H2 das unidades de α -glucosamina 6- e *N*-disulfatadas (A1 e A2), ao H1 do ácido α -idurônico 2-sulfatado (I1), ao H1 das unidades de α -glucosamina *N*-sulfatada (C1) e ao grupamento metil da α -glucosamina *N*-acetilada (CH₃) da solução padrão estão presentes em 5,40; 3,28; 5,22; 5,31 e 2,05 ppm, respectivamente. Os valores de ppm observados para cada sinal não devem variar mais do que $\pm 0,03$ ppm.

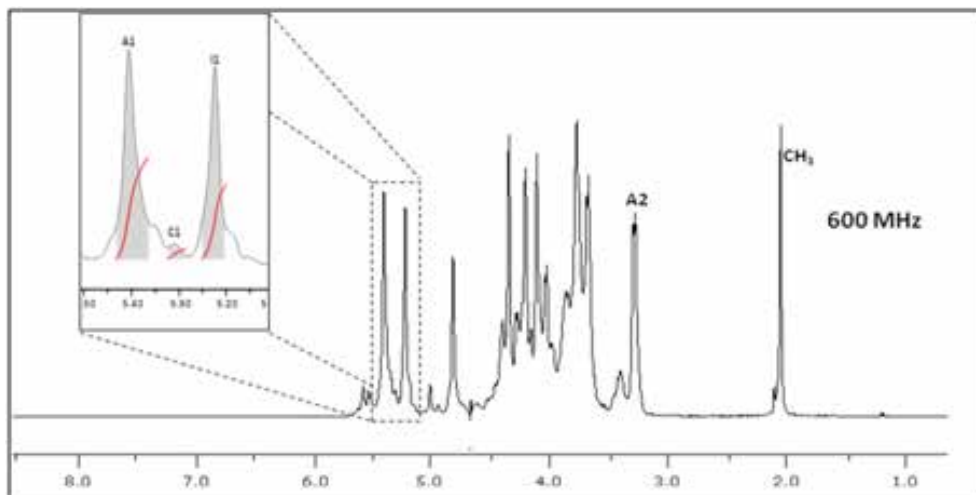
Critério de aceitação das amostras: os deslocamentos químicos dos sinais A1, C1, I1, A2 e CH₃ devem ser observados a 5,40; 5,31; 5,22; 3,28 e 2,05 ppm, respectivamente. Os valores de ppm observados para cada sinal não devem variar além de $\pm 0,03$ ppm. As integrais dos sinais A1, C1, I1 devem ser obtidas conforme a orientação dos painéis da **Figura 1**. Espectrômetros de maior resolução sugerem separações desses sinais (como mostrado para I1 no inserto do painel B), contudo são integrados em conjunto com o sinal principal. A integral de A1 é tomada como referência. Proceder ao cálculo de acordo com a fórmula:

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

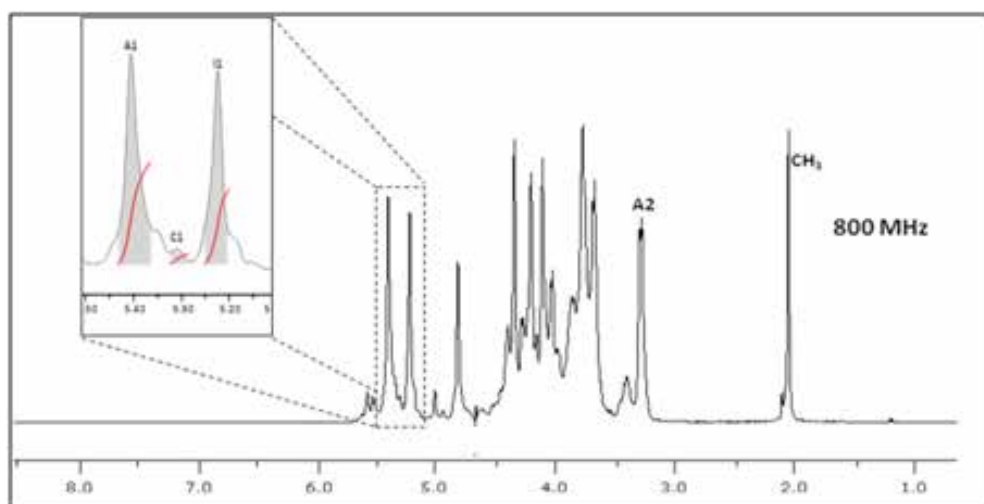
Obrigatoriamente, o valor obtido deve ser menor que 20%. Nenhum sinal não identificado no espectro, na região de 0,10 - 2,00; 2,10 - 3,20 e 5,70 - 8,00 ppm, deve ultrapassar 4% da altura do sinal A1 (5,40 ppm). Não deve ser observado o deslocamento químico em $2,16 \pm 0,03$ ppm, correspondentes às regiões *N*-acetil do condroitim sulfato supersulfatado.

Figura 1 – Heparina sódica suína analisada em espectrômetro.

A



B



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 II corresponde ao H1 do ácido α -idurônico 2-sulfatado em 5,21 ppm; C1 corresponde ao H1 das unidades de α -glucosamina N-sulfatada em 5,31 ppm; e metil da glucosamina N-acetilada em 2,05 ppm. Os valores de ppm observados para cada sinal não devem variar de $\pm 0,03$ ppm. 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 suína como: dermatam sulfato; condroitim sulfato e condroitim

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 mm); coluna de 250 mm de comprimento e 2,0 mm de diâmetro interno, empacotada com Ionpac AS11 HC (9 mm), mantida a 40 °C fluxo da fase móvel de 0,5 mL/min. Preparar as soluções conforme descrito a seguir.

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

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

Gradiente da fase móvel: adotar sistema de gradiente de 0 a 2,5 M de NaCl, como descrito na tabela a seguir:

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Eluição
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 suína: solubilizar heparina sódica suína (SQR) 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 dermatam sulfato (SQR) e condroitim sulfato supersulfatado (SQR) na concentração de 1,0 mg/mL e 0,4 mg/mL, respectivamente, na *Solução de referência de heparina sódica suína* na concentração de escolha, no momento de realizar o ensaio (Figuras 2B e 2A).

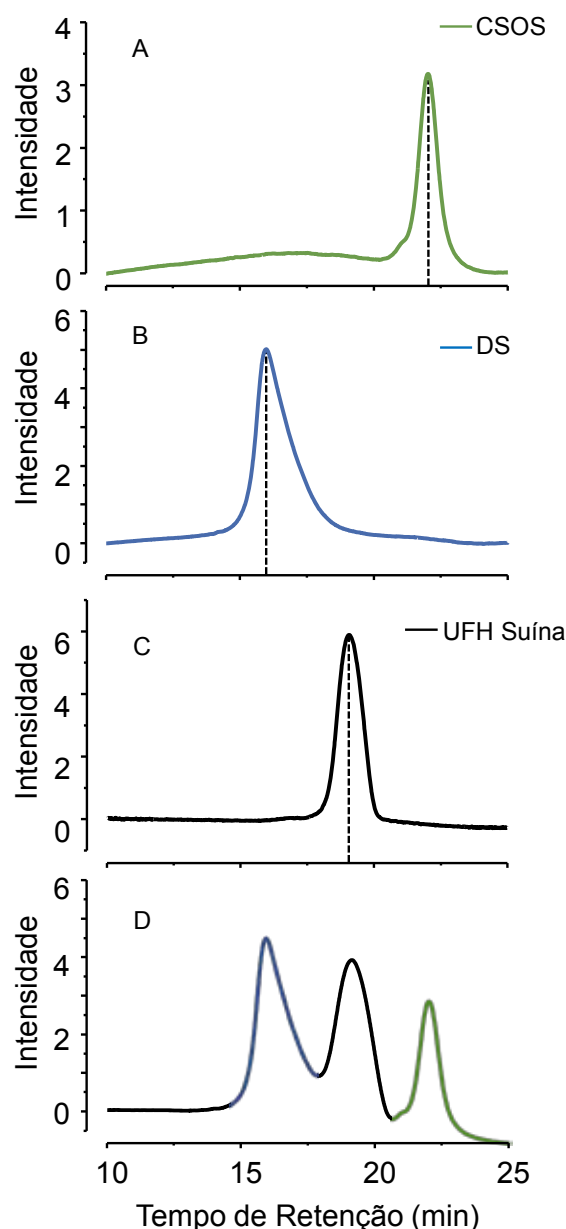
Solução amostra: solubilizar a amostra-teste na concentração de 4,0 mg/mL na fase móvel A.

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 suína* (Figura 2C). O tempo de retenção da heparina sódica suína é cerca de 19 minutos.

Adequação do sistema: a retenção relativa com referência à heparina sódica suína (tempo de retenção = cerca de 19 minutos) é de 0,8 para o dermatam sulfato e 1,1 para o condroitim sulfato supersulfatado. Na *Solução de adequação do sistema* a relação entre a altura do pico do dermatam sulfato SQR e o vale (linha de base entre os picos de dermatam sulfato e heparina) é de, no mínimo, 2,0. Para atingir esses requisitos devem ser escolhidas as concentrações adequadas das SQR.

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

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



Perfil de eluição do condroitim sulfato supersulfatado, dermatam sulfato e heparina sódica suína em cromatografia de troca iônica. Foram aplicadas 20 µg de CSOS (A), 50 µg de DS (B), 200 µg de heparina sódica suína (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 5 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.

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

Solução A: misturar 2 volumes de hidróxido de sódio 1% com 2 volumes de carbonato de sódio 5% e diluir para 5 volumes com água.

Solução B: misturar 2 volumes de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1,25% com 2 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 5 volumes com água.

Solução C: misturar 1 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 $10,25 \pm 0,25$ 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 5 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 min. Adicionar 0,5 mL da *Solução D*, misturar e deixar em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Medir as absorvâncias das soluções a 750 nm, utilizando a solução branco para ajuste do zero.

Curva de calibração: a relação da absorvância e concentração de proteína não é linear, contudo, se a faixa de concentração utilizada para traçar a curva padrão for suficientemente pequena, em último caso se aproximará da linearidade. Construir uma curva padrão, plotando as absorvâncias das soluções referência contra suas concentrações, utilizando regressão linear, traçar uma reta linear de melhor ajuste aos pontos plotados.

Determinar a concentração de proteína na solução amostra, através de sua absorvância e da curva padrão. No máximo 0,5% em relação à substância dessecada.

Impurezas nucleotídicas. Dissolver 40 mg em 10 mL de água. A absorvância é medida a 260 nm e o resultado não deve ser superior a 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). Determinar em estufa a vácuo a 60 °C por 3 horas. No máximo, 8%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo, 0,03 UE/UI de heparina sódica suína.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Método I

Atividade antifator IIa

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4: dissolver quantidades de tris (hidroximetil) aminometano para obter concentração de 20 mM, cloreto de sódio para 150 mM em água destilada contendo 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 mM. Antes do uso, diluir em *Tampão*

tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4 de modo a obter a solução 0,4 mM. Proceder ao abrigo de luz direta.

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

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

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

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

Medição cinética: os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo as proporções entre as preparações de padrão, amostra em teste e reagentes. Executar o teste em microplacas e realizar a leitura espectrofotométrica a 405 nm em um leitor de microplacas a 37 °C. O ensaio deve ser realizado com cada solução de heparina SQR e solução amostra em duplicata. Em cada poço da microplaca, adicionar 40 µL de *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 7,4* ou da *Solução amostra*, 25 µL da *Solução de antitrombina humana* e 10 µL da *Solução de fator IIa humano*. Após dois minutos de incubação a 37 °C, adicionar 25 µL da *Solução de substrato cromogênico para fator IIa humano*. Registrar a absorvância medida em 405 nm contra o branco durante 5 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 4 minutos e parar a reação com a adição de 50 µL de *Solução de parada*.

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

Ensaio sobre paralelismo: para cada série, calcular a regressão da absorvância ou mudança de absorvância/minuto contra as concentrações em escala logarítmica das soluções de amostra e das soluções de padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos

estatísticos para ensaios de linhas paralelas. Expressar a potência da heparina sódica suína em UI/mg, de base seca.

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

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

Atividade antifator Xa

Proceder conforme descrito em *Atividade antifator IIa*, com exceção da *Solução de fator IIa humano* que deve ser trocada por *Solução de fator Xa humano* e da *Solução de substrato cromogênico* dicloridrato de H-D-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-4-nitroanilida (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl) que deve ser trocada pela *Solução de substrato cromogênico* dicloridrato de N- α -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 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 sódica suína deve apresentar, no mínimo, 180 UI da atividade antifator IIa por mg. A razão da atividade antifator Xa/antifator IIa deve ser, no mínimo, 0,9, e, no máximo, 1,1.

B. Método II

Atividade antifator IIa

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4: dissolver 6,10 g de tris (hidroximetil) aminometano, 10,20 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 1 000 mL.

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

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

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

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

Solução padrão: reconstituir o conteúdo da ampola de heparina sódica suína 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 µL de *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*.

Todas as soluções de reagentes, padrão e amostra em teste devem ser pré-aquecidas a 37 °C por 15 minutos antes de serem adicionadas nos tubos. Transferir para cada um dos tubos plásticos, separadamente, um volume fixo (por exemplo, 50-100 µL) de cada uma das diferentes diluições de *Solução padrão*, ou *Solução*

amostra ou *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*. Adicionar em cada um dos tubos um volume dobrado da *Solução de antitrombina humana* (100-200 ml). Homogeneizar todos os tubos, suavemente, sem produzir bolhas, e incubar a 37 °C por, no mínimo, um minuto. Adicionar em cada tubo 25-50 µL da *Solução de trombina humana* e incubar a 37 °C por, no mínimo, um minuto. Adicionar 50-100 µL da *Solução de substrato cromogênico*, homogeneizar.

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

Medição cinética: registrar a mudança na absorbância para cada solução durante 1 minuto, medida em 405 nm. Expressar como mudança na absorção por minuto ($\Delta OD/min$) das soluções e dos brancos, os quais devem apresentar valores superiores devido à ausência de heparina. O desvio padrão relativo entre as leituras obtidas com o branco deve ser de menos do que 10%.

Medição "endpoint": parar a reação após 1 minuto com 50-100ml de solução de parada. Registrar a absorbância de cada solução a 405nm. O desvio padrão relativo entre as leituras obtidas com o branco deve ser de menos do 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 absorbância ou mudança de absorbância/minuto contra o logaritmo das concentrações das soluções de amostra e das soluções de padrões e calcular a potência da amostra utilizando métodos estatísticos para ensaios de linhas paralelas. Expressar a potência da heparina sódica suína em UI/mg, de base seca.

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

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

Atividade antifator Xa

Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4: dissolver quantidades de tris (hidroximetil) aminometano, ácido edético ou edetato de sódio, e cloreto de sódio em água destilada contendo 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 humana: reconstituir o conteúdo da ampola de antitrombina conforme recomendado pelo fabricante. Homogeneizar e diluir com *Tampão tris (hidroximetil) aminometano pH 8,4*, de modo a obter uma solução de antitrombina a 1,0 UI/mL.

Solução de fator 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 absorbância a 405 nm quando testada como descrito abaixo, substituindo os 30 µL de solução de amostra por 30 µL de solução tampão pH 8,4.

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

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

Solução padrão: reconstituir o conteúdo da ampola 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* pré-aquecida a 37 °C por 15 minutos, homogeneizar e incubar por dois minutos. Adicionar 300 µL da *Solução de substrato cromogênico para fator Xa* pré-aquecida a 37 °C por 15 minutos, homogeneizar e, após incubar por dois minutos, adicionar em cada tubo 150 µL da *Solução de parada* e 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) aminometano pH 8,4*, omitindo a *Solução padrão* e *Solução amostra*. Registrar a absorbância medida em 405 nm contra o branco.

Cálculos: determinar os valores do logaritmo da absorbância 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 suína 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 suína 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.

Tempo (minutos)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Eluição
0	90	10	Equilíbrio
0 – 60	90 → 30	10 → 70	Gradiente linear
60 – 65	30 → 0	70 → 100	Gradiente linear
65 – 70	0	100	Isocrático
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 não é maior que 1,5. A resolução entre os picos do fragmento de digestão II e do fragmento de digestão III não é menor que 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). 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

Tempo (minutos)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Eluição
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 2 horas e em refrigeração por até 12 horas.

de, exatamente, cerca de 10 mg da amostra. 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:

Solução padrão A: dissolver uma quantidade exatamente pesada 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 não é menor que 2,0. O fator de cauda para o pico de insulina não é maior que 1,8.

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

Procedimento: injetar um volume de cerca de 20 μ L da *Solução amostra*, registrar o cromatograma e medir as áreas de respostas para o pico de insulina principal, o pico de insulina desamido A-21 e picos de quaisquer outras impurezas. Calcular a porcentagem de insulina (%I), na parcela de insulina utilizada segundo a expressão:

$$\%I = 100 \times \left(\frac{r_1}{r_s} \right)$$

em que

r_1 = é a resposta do pico de insulina;

r_s = é a soma das respostas de 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 = é a resposta da insulina desamido A-21;

r_s = é a soma das respostas 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 sais 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 mesófilos aeróbicos (5.5.3.1.2). A contagem bacteriana total é de, no máximo, 300 UFC/g, sendo o teste realizado em uma parcela de, exatamente, cerca de 0,2 g da amostra.

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 desgaseificada 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, exatamente pesada, 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 3 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 não é maior que 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 não é menor que 2,0. O fator de cauda para o pico de insulina não é maior que 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:

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

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 6 meses.

Soluções padrão: diluir parcelas de *Solução estoque padrão* com *Diluyente* para obter duas soluções, uma contendo 1 unidade de insulina por mL (*Solução padrão 1*) e a outra contendo 2 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 40 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 1 unidade de insulina por mL (*Solução de ensaio 1*), baseando-se na suposta potência, e a outra que contenha 2 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 6 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.

Grupo	Primeira injeção	Segunda injeção
1	Solução padrão 2	Solução de ensaio 1
2	Solução padrão 1	Solução de ensaio 2
3	Solução de ensaio 2	Solução padrão 1
4	Solução de ensaio 1	Solução padrão 2

Amostras de sangue: 1 hora \pm 5 minutos e 2 horas e meia \pm 5 minutos após a injeção, coletar de cada coelho uma amostra adequada de sangue de uma veia marginal da orelha. O sangue também pode ser colhido de forma eficaz a partir da artéria central auricular.

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.

Grupo	Diferenças	Resposta individual (y)	Resposta total (T)	Desvios padrão das diferenças (S)
1	Solução padrão 2 – Solução de ensaio 1	y_1	T_1	S_1
2	Solução de ensaio 2 – Solução padrão 1	y_2	T_2	S_2
3	Solução de ensaio 2 – Solução padrão 1	y_3	T_3	S_3
4	Solução padrão 2 – Solução de ensaio 1	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 não é menor que 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 não for inferior a 15 unidades por mg, a exigência do teste foi atendida.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Observar a legislação vigente.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA HUMANA

$C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$; 5807,58

insulina humana; 04918

[11061-68-0]

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

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

IDENTIFICAÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Eluição
0	90	10	Equilíbrio
0 – 60	90 → 30	10 → 70	Gradiente linear
60 – 65	30 → 0	70 → 100	Gradiente linear
65 – 70	0	100	Isocrático
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 não é maior que 1,5. A resolução entre os picos do fragmento de digestão II e do fragmento de digestão III não é menor que 3,4.

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

elui ao mesmo tempo na insulina derivada de bovinos e suínos.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Perda por dessecação (5.2.9). Pesar, exatamente, cerca de 200 mg e secar a 105 °C por 16 horas. No máximo 10,0%.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.4)*. Determinar o teor de zinco em, exatamente, cerca de 10 mg da amostra. No máximo 1,0% para insulina humana anidra.

ENSAIOS DE PUREZA

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

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

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

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

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo 10 UE/mg de insulina humana.

DOSEAMENTO

Método físico-químico

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

substituto de insulina humana para insulina do começo ao fim.

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

Bioidentidade

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

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Observar a legislação vigente.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA HUMANA INJETÁVEL

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

IDENTIFICAÇÃO

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

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

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas* (5.3.3.4) ou *Espectrometria de absorção atômica* (5.2.13.1). Entre 10 µg e 40 µg para cada 100 UI de insulina para espécies apropriadas.

ENSAIOS DE PUREZA

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

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

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

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

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumprir o teste.

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). Contém, no máximo, 80 UE /100 UI de insulina.

DOSEAMENTO

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

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

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

em que

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

D = fator de diluição;

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

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

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

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA HUMANA ISOFANA SUSPENSÃO

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

IDENTIFICAÇÃO

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

CARACTERÍSTICAS

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

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco (5.3.3.4). Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.4)* ou

Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1). Entre 21 µg e 40 µg para cada 100 UI de insulina humana.

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

ENSAIOS DE PUREZA

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

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

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

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

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). Não contém mais de 80 UE/100 UI de insulina humana.

DOSEAMENTO

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

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Observar a legislação vigente.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA HUMANA ISOFANA SUSPENSÃO E INSULINA HUMANA INJETÁVEL

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

IDENTIFICAÇÃO

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

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.4)* ou *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Entre 0,02 mg e 0,04 mg para cada 100 UI de insulina humana.

ENSAIOS DE PUREZA

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

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

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

Conteúdo de insulina humana solúvel.

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

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

Solução teste de insulina solúvel: manter a temperatura a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ durante todo o procedimento. Transferir 5 mL da insulina humana injetável para um tubo de centrífuga. Adicionar 20 µL de hidróxido de sódio *M* e ajustar com ácido clorídrico 0,05 M ou hidróxido de sódio 0,05 M para um pH de $(8,20 \pm 0,02)$ se a concentração total de zinco for aproximadamente 20 µg/mL, ou ajustar para um pH de $(8,35 \pm 0,02)$ se a concentração total de zinco for 30 µg/mL. Registrar o volume, em µL, de ácido ou base requerido para ajustar o pH. Misturar e deixar em repouso durante uma hora. Centrifugar, transferir o sobrenadante para outro tubo de centrífuga e repetir a centrifugação. Transferir 2 mL do sobrenadante para outro tubo, adicionar 5 µL de ácido clorídrico 9,6 M e misturar.

Solução teste de insulina total: transferir 2 mL da insulina humana injetável para recipiente apropriado, adicionar 5 µL de ácido clorídrico 9,6 M e deixar a suspensão clarificar. Diluir a solução resultante com

ácido clorídrico 0,01 M para a mesma concentração teórica de insulina da *Solução teste de insulina solúvel* (por exemplo, se a insulina humana injetável for rotulada por conter 20% de insulina solúvel, o fator de diluição é $100/20 = 5$).

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

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

em que

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

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

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

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

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

Preparar as soluções descritas a seguir.

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

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

Solução teste de insulina solúvel que contenha 30% de insulina solúvel é $5 \times 3/2 = 7,5$).

Solução teste de insulina total: para cada mililitro da insulina humana injetável, adicionar 3 µL de ácido clorídrico 9,6 M, misturar e deixar a suspensão clarificar. Diluir a solução resultante com ácido clorídrico 0,01 M para 4 unidades de insulina humana por mililitro (por exemplo, se o produto está rotulado como contendo um total de 100 unidades de insulina humana por mililitro, o fator de diluição é 25). Calcular a quantidade de insulina humana solúvel como uma porcentagem de teor de insulina total da insulina humana injetável segundo a expressão:

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

em que

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

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

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

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo 80 UE/100 UI de insulina humana.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumprir o teste.

DOSEAMENTO

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

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

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

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA HUMANA ZINCO SUSPENSÃO

Insulina humana zinco suspensão é uma suspensão estéril de insulina humana em água tamponada para a injeção, modificada pela adição de um sal de zinco adequado de modo que a fase sólida da suspensão é constituída por uma mistura de insulina cristalina e amorfa em uma razão de cerca de 7 partes de cristais e de 3 partes de material amorfo. Contém, calculado com base na soma dos seus componentes de insulina e insulina desamido, no mínimo, 95,0% e, no máximo, 105,0% da quantidade declarada no rótulo, expressa em unidade de insulina humana por mililitro.

IDENTIFICAÇÃO

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

B. Centrifugar uma quantidade de suspensão representando 1000 unidades de insulina e descartar o sobrenadante. Suspender o resíduo em 8,4 mL de água, rapidamente acrescentar 16,6 mL de acetona tamponada SR, agitar vigorosamente e centrifugar dentro de 3 minutos após a adição da acetona tamponada. Desprezar o sobrenadante, repetir o tratamento com água e acetona tamponada SR, centrifugar e descartar o sobrenadante. Dissolver o resíduo cristalino em 5 mL de ácido clorídrico diluído (1 em 100). A insulina não extraída por acetona tamponada SR, determinada por um método adequado, está entre 63% e 77% do teor total de insulina de uma quantidade igual de suspensão.

CARACTERÍSTICAS

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

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.4)* ou *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. A quantidade de zinco total é entre 0,12 mg e 0,25 mg para cada 100 UI de insulina.

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

ENSAIO DE PUREZA

Limite de proteínas de alto peso molecular. Proceder conforme descrito em *Limite de proteínas de alto peso*

molecular na monografia de *Insulina injetável*. No máximo 1,5%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo 80 UE/100 UI de insulina humana.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

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

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

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

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA HUMANA ZINCO SUSPENSÃO ESTENDIDA

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

IDENTIFICAÇÃO

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

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

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

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.4)* ou *Espectrometria de*

absorção atômica (5.2.13.1). Entre 0,12 mg e 0,25 mg para cada 100 UI de insulina.

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

ENSAIO DE PUREZA

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

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

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo 80 UE/100 UI de insulina humana.

DOSEAMENTO

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

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Observar a legislação vigente.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA INJETÁVEL

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

IDENTIFICAÇÃO

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

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

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.4)* ou *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Entre 10 µg e 40 µg para cada 100 UI de insulina para espécies apropriadas.

ENSAIO DE PUREZA

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

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

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

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

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo, 80 UE/100 UI de insulina.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

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

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

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

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

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

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

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

em que

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

D = fator de diluição;

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

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

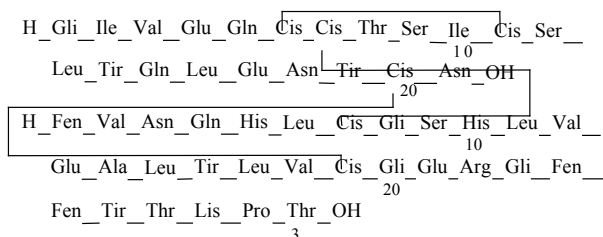
EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

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

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

INSULINA LISPRO



$C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$; 5807,58

insulina lispro; 04920

28B-L-lisina-29B-L-prolina

[133107-64-9]

Insulina lispro é idêntica em estrutura à insulina humana, exceto pelo fato de conter lisina e prolina nas posições 28 e 29, respectivamente, da cadeia B, enquanto esta sequência é invertida em insulina humana. Insulina lispro é produzida por síntese microbiana através de um processo de DNA recombinante. A quantidade, calculada na base seca, é igual ou superior a 27 unidades de insulina lispro por miligrama. O teor de pró-insulina lispro, determinado por um método adequado, é no máximo de 10 ppm. O teor de proteína derivado da célula hospedeira, determinado por um método adequado e validado, é no máximo de 10 ppm.

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

IDENTIFICAÇÃO

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

B. Determinar os fragmentos de peptídeos, utilizando o seguinte procedimento de mapeamento peptídico. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Preparar o *Tampão sulfato*, *Tampão HEPES* e *Solução teste de digestão*, conforme descrito no teste **B.** de *Identificação* da monografia *Insulina humana*. Utilizar o procedimento descrito na mesma monografia. Preparar a *Solução padrão de digestão* como descrito a seguir.

Solução padrão de digestão: proceder conforme descrito no teste **B.** de *Identificação* da monografia *Insulina humana*, exceto para o uso insulina lispro SQR, ao invés da insulina humana SQR.

Gradiente da Fase móvel: adotar o sistema de gradiente descrito na tabela a seguir. Preparar *Eluente A* e *Eluente B*, conforme descrito no teste **B.** de *Identificação* da

monografia *Insulina humana*; fluxo da *Fase móvel* de 0,8 mL/minuto.

<i>Tempo (min)</i>	<i>Eluente A (%)</i>	<i>Eluente B (%)</i>	<i>Eluição</i>
0 - 3	95	5	Isocrática
3 - 30	95 → 41	5 → 59	Gradiente linear
30 - 35	41 → 20	59 → 80	Gradiente linear
35 - 40	20 → 95	80 → 5	Retorno ao inicial
40 - 50	95	5	Reequilíbrio

CARACTERÍSTICAS

Perda por dessecação (5.2.9). Pesas, exatamente, cerca de 300 mg da amostra e secar a 105 °C por 16 horas. No máximo, 10,0%.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Teor de zinco. Proceder conforme descrito em *Titulações complexométricas (5.3.3.4)*. Determinar o teor de zinco em cerca de 20 mg da amostra. Entre 0,30% e 0,60%, em relação à base seca.

ENSAIOS DE PUREZA

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

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

Diluyente: proceder conforme descrito em *Doseamento*.

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

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

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

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Eluição
0 - 3	95	5	Isocrática
3 - 30	95 → 41	5 → 59	Gradiente linear
30 - 35	41 → 20	59 → 80	Gradiente linear
35 - 40	20 → 95	80 → 5	Retorna ao estado inicial
40 - 50	95	5	Re-equilíbrio

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

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

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

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

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

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

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo 10 UE/mg, utilizar a técnica cromogênica descrita em *Técnicas fotométricas*.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 214 nm; coluna de 100 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo

octadecilsilano (1,5 µm a 10 µm), mantida a temperatura de 40 °C; fluxo da *Fase móvel* de 0,8 mL/minuto.

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

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

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

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

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

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

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

em que

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

CU = concentração, em mg/mL, da insulina lispro na *Preparação de ensaio*;

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

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

Bioidentidade

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

Amostras de sangue: 45 ± 5 minutos e 2 horas e 30 minutos ± 5 minutos após a injeção, coletar de cada coelho uma amostra adequada de sangue de uma veia marginal da orelha. O sangue também pode ser colhido de forma eficaz a partir da artéria central auricular.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

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

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

METILCELULOSE
Methylcellulosum

metilcelulose; 05793

Celulose, metil éter

[9004-67-5]

Metilcelulose é parcialmente uma celulose O-metilada. Quando seco a 105 °C durante duas horas, contém, no mínimo 27,5% e, no máximo 31,5% de grupo metoxi (OCH₃).

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó ou granulado branco, branco amarelado ou branco esverdeado, higroscópico depois de seco.

Solubilidade. Praticamente insolúvel em água quente, acetona, éter etílico e em tolueno. Dissolve em água fria obtendo uma solução coloidal.

Constantes físico-químicas.

Viscosidade (5.2.7): a uma quantidade da amostra equivalente a 6 g da substância seca, adicionar 150 g de água aquecida a 90 °C, em constante agitação. Agitar durante 10 minutos, colocar em banho de gelo, continuar agitando por 40 minutos até completa dissolução. Ajustar a massa da solução para 300 g e centrifugar a solução. Ajustar a temperatura da solução a (20 ± 0,1) °C. A

viscosidade não é, no mínimo 75% e, no máximo, 140 % do valor estabelecido no rótulo, a 20 °C na velocidade de 100 cP.

IDENTIFICAÇÃO

A. Aquecer 10 mL da solução obtida em *Aspecto da solução* em banho-maria com agitação. Em temperatura acima de 50 °C a solução torna-se ou forma-se um precipitado floculento. A solução torna-se clara com resfriamento.

B. A 10 mL da solução obtida do *Aspecto da solução* adicionar 0,3 mL de ácido acético 2 M e 2,5 mL de uma solução de tanino a 10% (p/v). Um precipitado floculento branco amarelado é formado, o mesmo dissolve com amônia 6 M.

C. Em um tubo de aproximadamente 160 mm de comprimento, misturar 1 g da amostra com 2 g de um pó fino de sulfato de manganês. Introduzir a uma profundidade de 20 mm da parte superior do tubo, uma tira de papel de filtro impregnada com uma mistura recentemente preparada de um volume de solução de dietanolamina a 20% (v/v) e 11 volumes de uma solução de nitroprusseto de sódio a 5% (p/v) com o pH ajustado para 9,8 com ácido clorídrico M. Inserir o tubo cerca de 80 mm em um banho de silicone a temperatura entre 190 °C e 200 °C. O papel de filtro não se torna azul em 10 minutos. Fazer teste em branco.

D. Evaporar 1 mL da solução obtida em *Aspecto da solução*. Após evaporação da água é formado um fino filme.

E. Transferir 0,2 g da amostra para um tubo de ensaio. Não dissolve em 10 mL de tolueno e nem em 10 mL de etanol.

ENSAIOS DE PUREZA

Aspecto da solução. Adicionar, sobre constante agitação, uma quantidade de substância equivalente a 1 g da substância seca em 50 g de água livre de dióxido de carbono aquecida a 90 °C. Resfriar e ajustar a massa da solução para 100 g com água livre de dióxido de carbono e agitar até completa dissolução. Deixar em repouso entre 2 °C e 8 °C durante 1 hora. A solução obtida não é mais opalescente que a *Suspensão referência III (5.2.25)* e não mais corada que a *Solução padrão de cor SC F (5.2.12)*.

pH (5.2.19). O pH da solução obtida em *Aspecto da solução* é entre 5,5 e 8,0.

Cloretos (5.3.2.1). Diluir 1 mL da solução obtida em *Aspecto da solução* para 15 mL utilizando água. No máximo 0,5 % (5000 ppm).

Metais pesados (5.3.2.3). Determinar em 1 g da amostra. Utilizar o *Método III*. Preparar o padrão utilizando

Solução padrão de chumbo (10 ppm Pb). No máximo 0,002% (20 ppm).

Perda por dessecação (5.2.9). Determinar em 1 g da amostra. Dessecar em estufa a 105 °C, até peso constante. No máximo 10,0%.

Cinzas sulfatadas (5.2.10). Determinar em 1g da amostra. No máximo 1,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA.

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CATEGORIA

Agente de suspensão.

NADROPARINA CÁLCICA

Nadroparinum calcicum

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

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

A massa molecular média relativa deve variar de 3600 Da a 5000 Da, com um valor característico de cerca de 4300 Da. O grau de sulfatação deve estar em torno de dois sulfatos por unidade dissacarídica. A potência

não deve ser inferior a 95 UI nem superior a 130 UI de atividade antifator Xa por miligrama, calculada com referência à substância dessecada. A razão da atividade antifator Xa para atividade antifator IIa deve ser de 2,5 a 4,0.

IDENTIFICAÇÃO

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

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

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

ENSAIOS DE PUREZA

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

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

Solução de referência: diluir 1 mL de etanol SR em 100 mL de água purificada. Diluir 0,5 mL desta solução em 20 mL de água purificada.

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

Frasco branco: 1 mL de água purificada.

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

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

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

Procedimento: equilibrar cada frasco no sistema *headspace* a 90 °C durante 15 minutos. O tempo de pressurização da pré-injeção é de 1 minuto. O cromatograma obtido a partir do *Frasco referência* apresenta dois picos que correspondem ao etanol e ao

2-propanol no sentido em que o tempo de retenção aumenta (com tempos de retenção de aproximadamente 2,5 minutos e 4 minutos). Calcular o teor de etanol (m/m) levando em consideração sua densidade a 20°C, que deve ser de 0,792 g/mL.

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

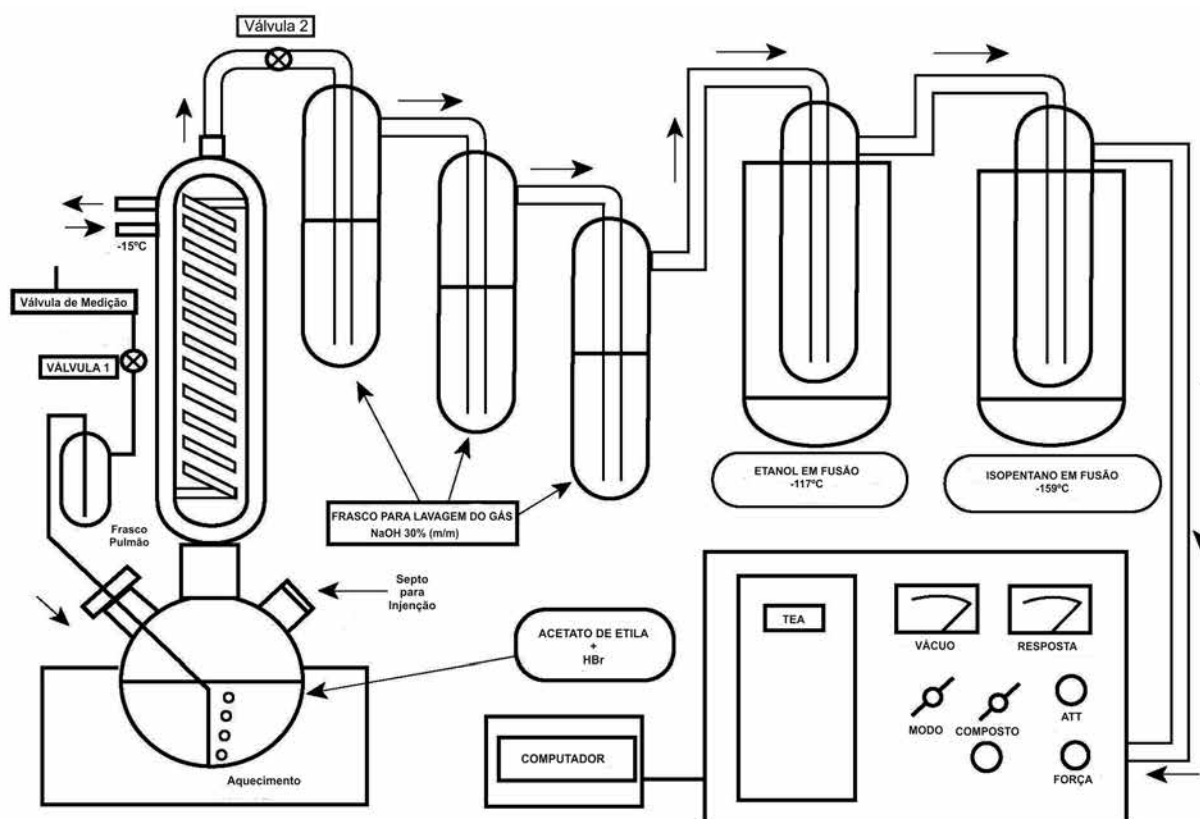


Figura 1 – Esquema do aparelho a ser utilizado na determinação de N-NO.

Descrição do aparelho (Figura 1). Utilizar um balão com três juntas de 500 mL de vidro borossilicato com fundo redondo, acima do qual está ligado um condensador que é equipado com:

- de um lado, uma junta torion através da qual pode ser introduzida uma corrente de argônio, por uma cânula;
- do outro lado, um conjunto de parafuso com um pistão equipado com um septo através do qual a *Solução de referência* e uma *Solução amostra* serão injetadas.

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

Preparação do detector de quimioluminescência: ligar o detector de quimioluminescência 48 horas antes da utilização e ligar a bomba de vácuo. O vácuo deve ser inferior a 0,5 mmHg. 1 hora antes da utilização, abrir a válvula de oxigênio a uma pressão de 0,2 MPa e uma velocidade de fluxo de 9,4 mL/minuto.

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

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

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

Secagem em balão de vidro de 500 mL borossilicato de fundo redondo e condensador: ferver 50 mL de acetato de etila sob refluxo durante 1 hora sob atmosfera de argônio sem ligar o sistema detector de quimioluminescência.

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

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

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

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

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

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

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

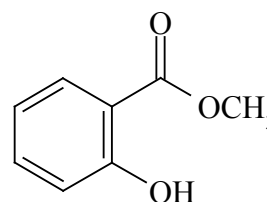
Solução de referência: dissolver 1,4787 g de sulfato de sódio anidro em água e diluir até 1000 mL utilizando o mesmo solvente. Diluir 1 mL desta solução para 200 mL com água destilada (5 ppm de íons sulfato).

Procedimento: eluir com uma solução de 1,91 g de tetraborato dissódico em 1000 mL de água purificada como fase móvel durante 15 minutos, mudar para 100% de hidróxido de sódio 0,1 M durante um período de 0,5 minutos; eluir com esta solução durante 10 minutos; voltar às condições iniciais por um período de 0,5 minutos; a taxa de fluxo é 1 mL/minuto.

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

SALICILATO DE METILA

Methylis salicylas



$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$; 152,15

salicilato de metila; 00344

2-Hidroxibenzoato de metila

[119-36-8]

Contém, no mínimo, 98,0% e, no máximo, 100,5% de $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Líquido incolor levemente amarelado, de odor característico.

Solubilidade. Pouco solúvel em água, miscível com etanol, clorofórmio, ácido acético glacial, ácidos graxos e óleos voláteis.

Constantes físico-químicas.

Densidade relativa (5.2.5): 1,180 a 1,186.

Índice de refração (5.2.6): 1,535 a 1,538.

Faixa de ebulição (5.2.3): 221 °C a 225 °C.

IDENTIFICAÇÃO

A. Aquecer durante 5 minutos em banho-maria mistura de 0,25 mL da amostra e 2 mL de hidróxido de sódio SR. Adicionar 3 mL de ácido sulfúrico a 5,5% (v/v). Produz-se precipitado branco cristalino. Filtrar, lavar o resíduo com água e dessecar a 105 °C. O resíduo obtido funde entre 156 °C e 161 °C (5.2.2).

B. Misturar uma gota da amostra com 5 mL de água. Adicionar uma gota de cloreto férrico SR. Desenvolve-se coloração violeta.

C. Aquecer algumas gotas da amostra com 5 mL de sulfato cúprico SR. Desenvolve-se coloração verde.

ENSAIOS DE PUREZA

Aspecto da solução. Adicionar 10 mL de etanol a 2 mL da amostra. A solução é límpida (5.2.25) e não mais corada do que a *Solução de referência (5.2.12)* descrita a seguir.

Solução de referência: misturar 2,5 mL da *Solução base de cloreto férrico*, 0,6 mL da *Solução base de cloreto de cobalto II* e 7 mL de ácido clorídrico a 1% (v/v). Diluir 2,5 mL dessa solução para 100 mL utilizando ácido clorídrico a 1% (v/v).

Acidez. Dissolver 5 g da amostra em 50 mL de etanol previamente neutralizado com hidróxido de sódio 0,1 M SV, utilizando verde de bromocresol SI até coloração azul. No máximo 0,4 mL de hidróxido de sódio 0,1 M SV são gastos para restaurar a coloração azul.

Metais pesados (5.3.2.3). Utilizar o *Método III*. No máximo 0,002% (20 ppm).

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA.

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Pesar, exatamente, cerca de 0,5 g da amostra e dissolver em 25 mL de etanol. Adicionar 0,05 mL de vermelho de fenol SI e neutralizar com hidróxido de sódio 0,1 M SV. À solução neutralizada adicionar 50 mL de hidróxido de sódio 0,1 M SV. Aquecer sob refluxo em banho-maria durante 30 minutos e resfriar. Titular com ácido clorídrico 0,1 M SV. Calcular o volume de hidróxido de sódio 0,1 M SV gasto na saponificação. Realizar ensaio em branco. A diferença entre as titulações representa a quantidade de hidróxido de sódio consumida na saponificação. Cada mL de hidróxido de sódio 0,1 M SV equivale a 15,215 mg de $C_8H_8O_3$.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Conservar ao abrigo da luz, hermeticamente fechado ao abrigo do calor.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Analgésico e antirreumático.

SOLUÇÃO DE ALBUMINA HUMANA

Albumini Humani Solutio

Solução de albumina humana é uma solução proteica, estéril e apirogênica obtida do plasma humano que está de acordo com as exigências da monografia *Plasma Humano para Fracionamento*.

A obtenção da albumina é realizada sob condições controladas particularmente no que tange ao pH, à força iônica e à temperatura, de modo que a concentração em albumina no produto final não seja inferior a 96% do teor total de proteínas.

A solução de albumina humana é preparada como uma solução concentrada contendo 150 g/L a 250 g/L de proteína total ou como uma solução isotônica contendo 35 g/L a 50 g/L de proteína total. Pode ser acrescentado contra os efeitos do calor um estabilizador como o caprilato de sódio (octanoato de sódio) ou *N*-acetiltryptofano ou uma combinação desses dois, a uma concentração adequada. Se forem acrescentadas substâncias para inativação viral na etapa de produção, um procedimento de purificação deve ser validado de modo a demonstrar que as concentrações dessas substâncias foram reduzidas a um nível aceitável, e

que tais resíduos não comprometem a segurança da preparação.

Nenhum conservante antimicrobiano é adicionado em qualquer fase da preparação. A solução final é submetida a uma filtração esterilizante e é distribuída assepticamente em recipientes estéreis que são, então, fechados de modo a evitar a contaminação. A solução no seu recipiente final é aquecida a $60,0 \pm 1,0$ °C e mantida a essa temperatura por tempo não inferior a 10 horas. Os recipientes são então incubados à temperatura entre 30 °C e 32 °C durante pelo menos 14 dias ou entre 20 °C e 25 °C durante pelo menos quatro semanas e analisados visualmente para evidenciar uma possível contaminação microbiana.

IDENTIFICAÇÃO

A. Fazer ensaios de precipitação utilizando soros antialbumina de diferentes espécies. Recomenda-se que o ensaio seja efetuado com soros específicos para albumina humana de cada espécie de animal doméstico habitualmente utilizado no país para a preparação de produtos de origem biológica. A solução contém proteínas humanas e dá resultados negativos com os soros antialbumina de outras espécies.

B. Fazer um ensaio utilizando um dos *Métodos Imunoquímicos (5.6)*, segundo técnica apropriada. Com o auxílio de um soro humano normal, comparar um soro normal com a amostra, após diluição prévia de ambos, de modo a conterem 10 g/L de proteínas. O componente principal da amostra corresponde ao componente principal do soro humano normal, podendo existir outras proteínas plasmáticas em pequenas quantidades.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Líquido límpido ligeiramente viscoso, geralmente incolor, amarelo acastanhado ou esverdeado.

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

pH (5.2.19). 6,7 a 7,3. Diluir a preparação a ser examinada com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) para obter uma solução contendo 10 g/L de proteína.

Composição de proteínas. Proceder conforme descrito em *Eletroforese (5.2.22)*, utilizando, como suporte, tiras de gel de acetato de celulose ou gel de agarose e, como solução de eletrólito, o tampão de barbital pH 8,6.

Nota: se a tira de acetato de celulose for a escolhida para a corrida, o método descrito abaixo pode ser utilizado. Se géis de agarose são utilizados, é porque eles fazem parte de um sistema automatizado de eletroforese e as instruções do fabricante deverão ser seguidas em seu lugar.

Solução amostra: diluir a amostra em uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) de modo a obter uma concentração de 20 g/L em proteínas.

Solução padrão: diluir um padrão de albumina humana para eletroforese com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até obter uma concentração de 20 g/L em proteínas.

Aplicar, em uma tira, 2,5 µL da *Solução amostra* em traços de 10 mm, ou depositar 0,25 µL por milímetro se for utilizada uma tira mais estreita. Aplicar nas mesmas condições um volume igual da *Solução padrão* em uma outra tira. Aplicar um campo elétrico apropriado de modo que o composto que se desloca mais rapidamente migre pelo menos 30 mm. Tratar as tiras com negro de amido 10B SR durante 5 minutos e em seguida com uma mistura de 10 volumes de ácido acético glacial e 90 volumes de metanol durante o tempo estritamente necessário para obter a descoloração do suporte. Provocar a transparência do suporte com uma mistura de 19 volumes de ácido acético glacial e 81 volumes de metanol. Determinar a absorvância das bandas em 600 nm com auxílio de um aparelho que, neste comprimento de onda, dê uma resposta linear no intervalo de medida. Realizar três determinações sobre cada tira e calcular a média das leituras para cada tira. No eletroforetograma da solução amostra, 5% das proteínas, quando muito, podem ter uma mobilidade diferente da banda principal. O ensaio só é válido se, no eletroforetograma obtido com a solução de referência, a proporção de proteínas contidas na banda principal estiver compreendida entre os limites estabelecidos pelo fabricante que acompanha a preparação de referência.

Distribuição do tamanho molecular. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 280 nm; coluna de 600 mm de comprimento e 7,5 mm de diâmetro interno ou 300 mm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica-gel hidrofílica (adequada ao fracionamento de proteínas globulares com relação massa moleculares na faixa de 10 000 a 500 000); fluxo da *Fase móvel* de 0,5 mL/minuto.

Fase móvel: solução contendo 4,873 g de fosfato de sódio dibásico di-hidratado, 1,741 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado, 11,688 g de cloreto de sódio e 50 mg de azida sódica, por litro de água ultrapurificada.

Solução amostra: diluir a amostra em uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até uma concentração apropriada ao sistema cromatográfico utilizado. Uma concentração compreendida entre 4 g/L e 12 g/L e a injeção de 50 µg a 600 µg de proteínas são geralmente adequadas.

O tempo de retenção será definido pelo equipamento e o tamanho da coluna utilizada, devendo ser desconsiderado o pico de estabilização. O pico produzido pela albumina deve ser simétrico e ser igual ou superior a 95% da área total do cromatograma. Após um breve espaço vazio, deverão surgir os picos produzidos pela presença

de polímeros e agregados. A área deste pico dividida por dois não deve ser maior que 5% da área total do cromatograma.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Alumínio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Empregar as seguintes condições: utilizar um forno de grafite como gerador de átomos, chama entre leituras, comprimento de onda de 309,3 nm ou outro adequado, largura da fenda de 0,5 nm, tubo piroliticamente revestido, com plataforma integrada e prioridade de correção desligado. Preparar as soluções como descrito a seguir.

Nota: utilizar recipientes de matéria plástica para a preparação das soluções e equipamentos plásticos, sempre que possível. Lavar a aparelhagem com ácido nítrico a 200 g/L antes da utilização.

Solução amostra: utilizar a amostra a ser analisada, diluída se necessário.

Solução de validação: utilizar um padrão internacional de albumina para validação do ensaio de alumínio.

Soluções de referência: preparar pelo menos três soluções de referência em uma escala que mede a concentração de alumínio esperada na preparação a ser examinada, por exemplo, diluindo a *Solução padrão de alumínio (10 ppm de alumínio Al)* com solução de octoxinol 10 a 1,0 g/L.

Solução de monitoramento: adicionar *Solução padrão de alumínio (10 ppm alumínio Al)* ou um material de referência certificado para a adequada solução em uma quantidade suficiente para aumentar a concentração de alumínio para 20 µg/L.

Solução branco: solução de octoxinol 10 a 1,0 g/L.

As condições de funcionamento encontradas na **Tabela 1** são citadas como um exemplo de condições adequadas encontradas para determinado aparelho e podem ser modificadas para obter melhores resultados.

Tabela 1 – Condições adequadas de funcionamento encontradas, citadas como exemplo.

<i>Passo</i>	<i>Temperatura final (°C)</i>	<i>Tempo de deslocamento (s)</i>	<i>Tempo decorrido (s)</i>	<i>Gás</i>
1	120	10	80	Argônio
2	200	5	20	Argônio
3	650	5	10	Argônio
4	1300	5	10	Argônio
5	1300	1	10	Nenhum gás
6	2500	0,7	4	Nenhum gás
7	2600	0,5	3	Argônio
8	20	12,9	3	Nenhum gás

Procedimento: injetar três vezes a *Solução branco*, as *Soluções de referência*, a *Solução amostra* e a *Solução de monitoramento*. A recuperação do alumínio adicionado na preparação da *Solução de monitoramento* está dentro do intervalo de 80% a 120%. Determinar as absorvâncias. Construir uma curva analítica a partir da média das leituras obtidas com as *Soluções de referência* e determinar o teor de alumínio na preparação a ser analisada através da curva analítica. No máximo 200 µg/L.

Ativador da pré-caliceína. Proceder conforme descrito em *Determinação do título do ativador da pré-caliceína (5.5.1.11)*. A amostra não contém mais de 35 UI de ativador da pré-caliceína por mililitro.

Hemoglobina. Diluir a amostra com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até uma concentração de 10 g/L em proteínas. Determinar a absorvância (5.2.14) em 403

nm, utilizando água como branco. A absorvância não é superior a 0,15.

Potássio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de emissão atômica (5.2.13.2)*. Determinar a intensidade emitida em 766,5 nm. A amostra não contém mais de 0,05 milimol de K⁺ por grama de proteínas.

Sódio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de emissão atômica (5.2.13.2)*. Determinar a intensidade emitida em 589 nm. A amostra contém, no mínimo, 95% e, no máximo, 105% do teor de sódio indicado no rótulo e, no máximo, 160 milimol de Na⁺ por litro.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Pirogênios (5.5.2.1). Cumpre o teste.

Nota: no caso de uma solução contendo 35 g/L a 50 g/L de proteínas, injetar em cada coelho, por quilograma de massa corporal, 10 mL da preparação a ser examinada. No caso de uma solução contendo 150 g/L a 250 g/L de proteínas, injetar em cada coelho, por quilograma de massa corporal, 5 mL da preparação a ser examinada.

DOSEAMENTO

Proteínas totais

Diluir a preparação com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) para obter uma solução que se espera conter aproximadamente 15 mg de proteína em 2 mL. Em um tubo de centrifugação de fundo arredondado introduzir 2 mL dessa solução. Adicionar 2 mL de solução de molibdato de sódio a 75 g/L e 2 mL de uma mistura de ácido sulfúrico livre de nitrogênio e água (1:30). Agitar, centrifugar durante 5 minutos, decantar o líquido sobrenadante e inverter o tubo, permitindo que o seu conteúdo escorra sobre papel de filtro. Determinar o teor de nitrogênio presente no resíduo após mineralização de acordo com *Determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (5.3.3.2)* e calcular o teor de proteínas multiplicando a quantidade de nitrogênio por 6,25. A preparação contém, no mínimo, 96% e, no máximo, 105% da quantidade de proteína declarada no rótulo.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Ao abrigo da luz.

ROTULAGEM

Observar legislação vigente. O rótulo deve conter o nome da preparação, volume da preparação, conteúdo em proteínas expresso em gramas por litro, conteúdo de sódio expresso em milimol por litro, nome e concentração de qualquer substância adicionada à preparação (exemplo: estabilizante) e que o produto não deverá ser usado se houver turvação ou depósito.

SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-A PARA USO HUMANO

Immunoserum adversus A

DEFINIÇÃO

São preparações líquidas, estéreis, de cor azul artificial, límpidas, sem a presença de partículas em suspensão, contendo aglutininas específicas para o grupo sanguíneo

“A” ou “A,B” (incluindo os subgrupos A1, A2, A1B e A2B), obtidas do plasma ou soro humano ou de cultura de célula (hibridoma). Devem possuir conservante antimicrobiano. Quando apresentadas em forma liofilizada, após a sua reconstituição, devem possuir as mesmas características físicas descritas para preparações líquidas. Não devem possuir contaminação por outros anticorpos reativos contra outros antígenos eritrocitários humanos, como o $M^g \cdot W^{ra}$ e outros cuja frequência seja superior a 1% da população. Quando obtidas do fracionamento do plasma humano, este deve apresentar altos títulos para este anticorpo. Devem ser testadas com eritrócitos dos grupos “O” e “B” comprovando a sua não especificidade para estes grupos sanguíneos. Realizar teste de potência comparando o reagente com um soro de referência anti-A reconhecido apresentando resultado equivalente ou superior, quando testado numa mesma amostra de suspensão de hemácias do grupo sanguíneo A.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Inspeccionar visualmente durante o armazenamento e imediatamente antes do uso. Se a cor ou a aparência física for anormal ou se houver qualquer indício ou suspeita de contaminação microbiana, a unidade é imprópria para uso.

DOSEAMENTO

Testes laboratoriais. Testes laboratoriais devidamente validados são realizados de modo a garantir os parâmetros de qualidade descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Parâmetros de qualidade para o soro reagente de tipagem sanguínea anti-A para uso humano.

Painel de hemácias	Intensidade de aglutinação (mínima)	Teste de avidéz	Título
A ₁	3+	Até 15 segundos	256
A ₂	2+	Até 30 segundos	128
A ₁ B	3+	Até 30 segundos	128
A ₂ B	2+	Até 45 segundos	64

EMBALAGEM

Frasco contendo 10 mL do soro reagente de tipagem sanguínea anti-A para uso humano, acompanhado de conta-gotas. Cada gota equivale a aproximadamente 50 µL.

ROTULAGEM

Observar legislação vigente. O rótulo das embalagens deve ter o fundo branco com letras de cor azul. Deve constar na bula que o soro foi testado para os vírus da hepatite B, hepatite C e HIV, porém nenhuma metodologia conhecida oferece segurança para os produtos derivados do sangue humano e que os cuidados de biossegurança devem ser respeitados. Quando obtido do plasma/soro humano, deve satisfazer às exigências da monografia *Plasma humano para fracionamento*. Além disso, o rótulo ou a bula devem conter, no mínimo, as seguintes recomendações: que a tipagem sanguínea deve ser realizada em tubo ou placa em U; que o prazo de validade depende da forma de apresentação do soro (forma líquida: até um ano se conservado a 4 ± 2 °C e até dois anos se conservado à temperatura ≤ -20 °C; forma liofilizada: até cinco anos e, depois de reconstituído, até um ano se conservado a 4 ± 2 °C).

SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-A,B PARA USO HUMANO

Immunoserum adversus A,B

DEFINIÇÃO

São preparações líquidas, estéreis, incolores, límpidas, sem a presença de partículas em suspensão, capazes de aglutinar eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “A”, “B” ou “A,B” (incluindo os subgrupos “A₁B” e “A₂B”), obtidas do plasma ou soro humano ou de cultura de célula (hibridoma). Devem possuir conservante antimicrobiano. Quando apresentadas em forma liofilizada, após a sua reconstituição, devem possuir as mesmas características físicas descritas para preparações líquidas. Não devem possuir contaminação por outros anticorpos reativos contra outros antígenos eritrocitários humanos, como o M^g.^{Wia} e outros cuja frequência seja superior a 1% da população. Quando obtidas do fracionamento do plasma humano, este deve apresentar altos títulos para este anticorpo. Devem ser testadas com eritrócitos do grupo “O” comprovando a sua não especificidade para este grupo sanguíneo. Realizar teste de potência comparando o reagente com um soro de referência anti-A,B reconhecido apresentando resultado equivalente ou superior, quando testado numa mesma amostra de suspensão de hemácias do grupo sanguíneo A,B.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Inspeccionar visualmente durante o armazenamento e imediatamente antes do uso. Se a cor ou a aparência física for anormal ou se houver qualquer

indício ou suspeita de contaminação microbiana, a unidade é imprópria para uso.

DOSEAMENTO

Testes laboratoriais. Testes laboratoriais devidamente validados são realizados de modo a garantir os parâmetros de qualidade descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Parâmetros de qualidade para soro reagente de tipagem sanguínea anti-A,B para uso humano.

Painel de hemácias	Intensidade de aglutinação (mínima)	Teste de avidéz	Título
A ₁	3+	Até 15 segundos	256
A ₁ B	3+	Até 15 segundos	256
B	3+	Até 15 segundos	256
A ₂	3+	Até 30 segundos	128

EMBALAGEM

Frasco contendo 10 mL do soro reagente de tipagem sanguínea anti-A,B para uso humano, acompanhado de conta-gotas. Cada gota equivale a aproximadamente 50 µL.

ROTULAGEM

Observar legislação vigente. O rótulo das embalagens deve ter o fundo branco com letras de cor laranja. Deve constar na bula que o soro foi testado para os vírus da hepatite B, hepatite C e HIV, porém nenhuma metodologia conhecida oferece segurança para os produtos derivados do sangue humano e que os cuidados de biossegurança devem ser respeitados. Quando obtido do plasma/soro humano deve satisfazer às exigências da monografia *Plasma humano para fracionamento*. Além disso, o rótulo ou a bula devem conter, no mínimo, as seguintes recomendações: que a tipagem sanguínea deve ser realizada em tubo ou placa em U; que o prazo de validade depende da forma de apresentação do soro (forma líquida: até um ano se conservado a 4 ± 2 °C e até dois anos se conservado à temperatura ≤ -20 °C; forma liofilizada: até cinco anos e, depois de reconstituído, até um ano se conservado a 4 ± 2 °C).

SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-B PARA USO HUMANO

Immunoserum adversus B

DEFINIÇÃO

São preparações líquidas, estéreis, de cor amarelo artificial, límpidas, sem a presença de partículas em suspensão, capazes de aglutinar eritrócitos humanos do grupo sanguíneo "B" ou "A,B" (incluindo os subgrupos "A1B" e "A2B"), obtidas do plasma ou soro humano ou de cultura de célula (hibridoma). Devem possuir conservante antimicrobiano. Quando apresentadas em forma liofilizada, após a sua reconstituição, devem possuir as mesmas características físicas descritas para preparações líquidas. Não devem possuir contaminação por outros anticorpos reativos contra outros antígenos eritrocitários humanos, como o $M^g \cdot W^{ia}$ e outros cuja frequência seja superior a 1% da população. Quando obtidas do fracionamento do plasma humano, este deve apresentar altos títulos para este anticorpo. Devem ser testadas com eritrócitos dos grupos "A" e "O" comprovando a sua não especificidade para estes grupos sanguíneos. Realizar teste de potência comparando o reagente com um soro de referência anti-B reconhecido apresentando resultado equivalente ou superior, quando testado numa mesma amostra de suspensão de hemácias do grupo sanguíneo B.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Inspeccionar visualmente durante o armazenamento e imediatamente antes do uso. Se a cor ou a aparência física for anormal ou se houver qualquer indício ou suspeita de contaminação microbiana, a unidade é imprópria para uso.

DOSEAMENTO

Testes laboratoriais. Testes laboratoriais devidamente validados são realizados de modo a garantir os parâmetros de qualidade discriminados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Parâmetros de qualidade para o soro reagente de tipagem sanguínea anti-B para uso humano.

Painel de hemácias	Intensidade de aglutinação (mínima)	Teste de avidéz	Título
B	3+	Até 15 segundos	256
A ₁ B	3+	Até 15 segundos	256

EMBALAGEM

Frasco contendo 10 mL do soro reagente de tipagem sanguínea anti-B para uso humano, acompanhado de conta-gotas. Cada gota equivale a aproximadamente 50 μ L.

ROTULAGEM

Observar legislação vigente. O rótulo das embalagens deve ter o fundo branco com letras de cor amarela. Deve constar na bula que o soro foi testado para os vírus da hepatite B, hepatite C e HIV, porém nenhuma metodologia conhecida oferece segurança para os produtos derivados do sangue humano e que os cuidados de biossegurança devem ser respeitados. Quando obtido do plasma/soro humano deve satisfazer às exigências da monografia *Plasma humano para fracionamento*. Além disso, o rótulo ou a bula devem conter, no mínimo, as seguintes recomendações: que a tipagem sanguínea deve ser realizada em tubo ou placa em U; que o prazo de validade depende da forma de apresentação do soro (forma líquida: até um ano se conservado a 4 ± 2 °C e até dois anos se conservado à temperatura ≤ -20 °C; forma liofilizada: até cinco anos e, depois de reconstituído, até um ano se conservado a 4 ± 2 °C).

SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-RH (ANTI-D, ANTI-C, ANTI-E, ANTI-c, ANTI-e E ANTI-C^w) PARA USO HUMANO

Immunoserum adversus Rh

DEFINIÇÃO

São preparações líquidas, estéreis, incolores, límpidas, sem a presença de partículas em suspensão, aglutininas para antígenos do sistema ABO e aloanticorpos, obtidas do plasma ou soro humano ou a partir de cultura de célula (hibridoma). Devem possuir conservante antimicrobiano. Quando apresentadas em forma liofilizada, após a sua reconstituição, devem possuir as mesmas características físicas observadas nas preparações líquidas. Não devem ser adicionados corantes artificiais. Podem ser apresentadas na forma de imunoglobulina IgM em solução salina com baixa concentração proteica, na forma de IgG em solução com alta concentração proteica, na forma de misturas das imunoglobulinas IgG e IgM ou ainda a IgG modificada quimicamente.

C

ARACTERÍSTICAS

Aspecto. Inspecionar visualmente durante o armazenamento e imediatamente antes do uso. Se a cor ou a aparência física for anormal ou se houver qualquer indício ou suspeita de contaminação microbiana, a unidade é imprópria para uso.

DOSEAMENTO

Testes laboratoriais. Testes laboratoriais devidamente validados são realizados de modo a garantir os parâmetros de qualidade relacionados na **Tabela 1** e na **Tabela 2**.

Os principais soros para tipagem do sistema Rh estão listados na **Tabela 1**, cada um reagindo com o(s) antígeno(s) designado(s) pela letra correspondente (terminologia de Fisher-Race) e a nomenclatura alternativa (Weiner).

Tabela 1 – Terminologia segundo Fisher-Race e Weiner.

Anti-soro	Antígeno	
	Fisher-Race	Weiner
Anti-D	D	Rh ₀
Anti-C	C	rh'
Anti-E	E	rh''
Anti-CD	D e C	Rh ₀ e rh'
Anti-DE	D e E	Rh ₀ e rh''
Anti-CDE	D, C e E	Rh ₀ , rh' e rh''
Anti-c	c	hr'
Anti-e	e	hr''
Anti-C ^w	C ^w	rh'w

Cada soro deve atender aos requisitos do teste para potência. No caso de soros salinos para teste em tubos de ensaio são feitos em paralelo com o soro padrão de referência anti-D, anti-C ou anti-E, não podendo os resultados ser inferiores ao padrão. Não há padrão de referência para o anti-c e anti-e em meio salino, devendo o teste de reatividade utilizar suspensão de hemácias de 3% a 5% com fenótipos conforme a **Tabela 2**.

No caso de soros para uso em placa ou em tubo para teste rápido são feitos em paralelo com o soro padrão de referência anti-D, anti-C, anti-E, anti-c ou anti-e, não podendo os resultados ser inferiores ao padrão, devendo o teste de reatividade utilizar suspensão de hemácias de 3% a 5% com fenótipos conforme a **Tabela 2**.

O teste de avidéz para os soros reagentes para uso em placa e tubo atendem os mesmos requisitos do teste de potência descrito nas monografias *Soro reagente de tipagem sanguínea anti-A para uso humano*, *Soro reagente de tipagem sanguínea anti-B para uso humano* e *Soro reagente de tipagem sanguínea anti-A,B para uso humano*.

Podem ser utilizadas hemácias do grupo A, B, AB ou O.

Tabela 2 - Relação entre anticorpos e fenótipos das células.

Soro	Fenótipo da célula
Anti-D	cDe
Anti-C	Ccde
Anti-E	cdEe
Anti-CD	cDe, Ccde
Anti-DE	cDe, cdEe
Anti-CDE	cdEe, cDe, Ccde
Anti-c	CcDEe
Anti-e	cdEe
Anti-C ^w	rh ^{w1}

O soro anti-D (anti-Rh(D) ou anti-Rho) deve apresentar reatividade de 3+, no mínimo com hemácias "O" R0r, "O" R1r e "O" R2r; avidéz de até 30 segundos e no máximo título 32. O soro anti-D em meio salino deve apresentar reatividade de 1+, no mínimo com hemácias "O" R0r, "O" R1r e "O" R2r; máximo título 8.

O soro anti-D não pode reagir com hemácias Rh negativas (rr), em temperatura ambiente e a 37 °C ou no teste indireto da antiglobulina humana (teste de Coombs indireto), sem potencializador. O soro tem que detectar D fraco. O soro controle deve possuir nas mesmas concentrações as substâncias utilizadas, inclusive as proteínas e conservantes, e não deve apresentar reação de aglutinação com as hemácias "O" R0r, R1r, R2r.

Cada soro deve atender aos requisitos dos ensaios de especificidade para o método mais sensível, recomendado pelo fabricante, em que devem ser testados com pelo menos quatro fenótipos positivos e quatro fenótipos negativos conforme **Tabela 3**. Deve ser demonstrada a ausência de contaminação de anticorpos reativos para os antígenos M^s e W^r^a, assim como outros antígenos que possuem incidência de 1% ou mais na população em geral.

Tabela 3 – Relação dos fenótipos a serem testados.

Soro	Células
Anti-D	CcDe, cDe, Ccde, cdEe, A ₁ cde, B cde, O cde, o teste deve ser realizado pela técnica de antiglobulina indireta, utilizando-se células de três diferentes doadores
Anti-C	cDe, Ccde, cdEe, C + rh ₁ neg. células, A ₁ cde, B cde, O cde
Anti-E	cDe, Ccde, cdEe, A ₁ cde, B cde, O cde
Anti-CD	cDe, Ccde, cdEe, A ₁ cde, B cde, O cde, e onde recomendado para a detecção do antígeno G, r ^G r
Anti-DE	cDe, Ccde, cdEe, A ₁ cde, B cde, O cde
Anti-CDE	cDe, Ccde, cdEe, A ₁ cde, B cde, O cde, e onde recomendado para a detecção do antígeno G, r ^G r
Anti-c	Ccde, A ₁ CDe, B CDe, O CDe, e CDEe ou CDE ou CdE
Anti-e	cdEe, A ₁ cDE, B cDE, O cDE, e CcDE ou CDE ou CdE
Anti-C ^w	rh ^{w1} , A ₁ rh ^{w1} , B rh ^{w1} e O CDe, e CDEe

Todos os glóbulos vermelhos em suspensão usados para estes procedimentos devem ser validados e seus registros mantidos.

Antígenos com maior incidência na população brasileira são os seguintes: A, B, H, Le^a, Le^b, I, K, k, Kp^a, Kp^B, Ic^C, Pl, D, C, E, c, e, C^w, M, N, S, s, U, Lu^a, Lu^b, Jk^A, Jk^b, Fy^a, Fy^b, Di^a e Di^B.

São também conhecidos

Ga, Do^a, Do^b, Yt^a, Yt^B, Lan, Co^a, Co^b, M^g, Wr^a e Sd^a.

EMBALAGEM

Frasco contendo 10 mL do soro reagente de tipagem sanguínea para uso humano específico acompanhado de conta-gotas. Cada gota equivale a aproximadamente 50 µL.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente. O rótulo ou a bula devem conter, no mínimo, as seguintes recomendações:

que a tipagem sanguínea deve ser realizada em tubo ou placa em U;

que o prazo de validade depende da forma de apresentação do soro (forma líquida: até um ano se conservado a 4 ± 2 °C e até dois anos se conservado a temperatura ≤ -20 °C; forma liofilizada: até cinco anos e, depois de reconstituído, até um ano se conservado a 4 ± 2 °C).

SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA SUSPENSÃO ORAL

Contém, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 110,0% da quantidade declarada de sulfametoxazol (C₁₀H₁₁N₃O₃S) e trimetoprima (C₁₄H₁₈N₄O₃).

IDENTIFICAÇÃO

O teste **A**. refere-se à identificação da trimetoprima e o teste **B**. refere-se à identificação do sulfametoxazol. O teste de identificação **D**. pode ser omitido se for realizado o teste **C**.

A. A um volume da suspensão oral equivalente a 40 mg de trimetoprima, adicionar 30 mL de hidróxido de sódio 0,1 M e agitar. Proceder conforme descrito no teste **B**. de Identificação na monografia de Sulfametoxazol e trimetoprima comprimidos.

B. Utilizar a camada aquosa obtida no teste **A**. de Identificação e proceder conforme descrito no teste **A**. de Identificação na monografia de Sulfametoxazol e trimetoprima comprimidos.

C. Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada (5.2.17.1)*, utilizando sílica-gel G, como suporte, e mistura de clorofórmio, metanol e dimetilformamida (100:10:5), como fase móvel. Aplicar, separadamente, à placa, 5 µL de cada uma das soluções, recentemente preparadas, descritas a seguir.

Solução (1): adicionar 20 mL de metanol à quantidade de suspensão oral equivalente a 0,4 g de sulfametoxazol e 80 mg de trimetoprima. Adicionar 10 g de sulfato de sódio anidro e homogeneizar. Centrifugar e utilizar o sobrenadante.

Solução (2): preparar solução de sulfametoxazol SQR a 2% (p/v) em metanol.

Solução (3): preparar solução de trimetoprima SQR a 0,4% (p/v) em metanol.

Desenvolver o cromatograma. Remover a placa, deixar secar ao ar. Nebulizar com iodobismutato de potássio diluído. As manchas referentes ao sulfametoxazol e trimetoprima com a *Solução (1)* correspondem em posição, cor e intensidade àquelas obtidas com a *Solução (2)* e a *Solução (3)*.

D. Os tempos de retenção dos picos principais do cromatograma da *Solução amostra*, obtida no método **B.** de *Doseamento*, correspondem àqueles dos picos principais da *Solução padrão*.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

pH (5.2.19). 5,0 a 6,5.

ENSAIOS DE PUREZA

Limite de produto de degradação da trimetoprima.

Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada (5.2.17.1)*, utilizando sílica-gel GF₂₅₄ como suporte, e mistura de clorofórmio, metanol e hidróxido de amônio (80:20:2), como fase móvel. Aplicar, separadamente, à placa, 5 µL de cada uma das soluções, recentemente preparadas, descritas a seguir.

Solução (1): transferir volume de suspensão oral equivalente a 40 mg de trimetoprima para funil de separação. Extrair com três porções de 25 mL de mistura de clorofórmio e metanol (8:2). Reunir os extratos clorofórmicos em bquer e evaporá-los em banho-maria até secura. Dissolver o resíduo em 2 mL do mesmo solvente.

Solução (2): preparar solução a 20 mg/mL de trimetoprima SQR em mistura de clorofórmio e metanol (8:2).

Solução (3): diluir volume da *Solução (2)* em mistura de clorofórmio e metanol (8:2) de modo a obter solução a 0,1 mg/mL.

Desenvolver cromatograma. Remover a placa, deixar secar ao ar. Examinar sob luz ultravioleta (254 nm). A trimetoprima apresenta mancha com Rf de aproximadamente 0,7 e seu produto de degradação apresenta mancha com Rf entre 0,3 e 0,5. Qualquer mancha obtida no cromatograma com a *Solução (1)*, com Rf de aproximadamente 0,3 e 0,5, não é maior em tamanho e intensidade que aquela obtida com a *Solução (3)* (0,5%).

Limite de sulfanilamida, ácido sulfanílico e sulfametoxazol N₄-glucosídeo. Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada (5.2.17.1)*, utilizando sílica-gel G, como suporte, e mistura de etanol e metanol (95:5), heptano, clorofórmio e ácido acético glacial (25:25:25:7), como fase móvel.

Aplicar, separadamente, à placa, 50 µL de cada uma das soluções, recentemente preparadas, descritas a seguir.

Solução (1): transferir volume de suspensão oral equivalente a 0,2 g de sulfametoxazol para balão volumétrico de 100 mL, contendo 10 mL de hidróxido de amônio. Adicionar 50 mL de metanol. Agitar durante 3 minutos e completar volume com o mesmo solvente. Filtrar.

Solução (2): transferir 20 mg de sulfametoxazol SQR para balão volumétrico de 10 mL. Dissolver em 1 mL de hidróxido de amônio e completar volume com metanol.

Solução (3): transferir 10 mg de sulfanilamida SQR para balão volumétrico de 50 mL. Dissolver em 5 mL de hidróxido de amônio e completar volume com metanol. Transferir 5 mL dessa solução para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 10 mL de hidróxido de amônio e completar volume com metanol.

Solução (4): transferir 10 mg de ácido sulfanílico SQR para balão volumétrico de 50 mL, dissolver em 5 mL de hidróxido de amônio e completar o volume com metanol. Transferir 3 mL dessa solução para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 10 mL de hidróxido de amônio e completar o volume com metanol.

Solução (5): transferir 3 mg de sulfametoxazol N₄-glucosídeo SQR para balão volumétrico de 50 mL. Dissolver em 5 mL de hidróxido de amônio e completar volume com metanol.

Desenvolver cromatograma. Remover a placa, deixar secar ao ar. Nebulizar com reagente de Erlich modificado e deixar em repouso durante 15 minutos. O sulfametoxazol apresenta manchas com Rf de cerca de 0,7. Quaisquer manchas obtidas no cromatograma com a *Solução (1)*, com Rf de aproximadamente 0,5, 0,1 e 0,3, não são maiores em tamanho e intensidade que as manchas obtidas nos cromatogramas com as *Soluções (3), (4) e (5)*, respectivamente, correspondendo a não mais que 0,5% de sulfanilamida, 0,3% de ácido sulfanílico e 3,0 % de sulfametoxazol N₄-glucosídeo.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Contagem de micro-organismos viáveis totais (5.5.3.1.2). Bactérias totais: no máximo 1000 UFC/mL. Fungos e leveduras: no máximo 100 UFC/mL.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no ultravioleta e visível (5.2.14)*. Proteger as soluções da luz.

Procedimento para o sulfametoxazol: transferir para funil de separação volume da suspensão oral equivalente a 0,2 g de sulfametoxazol. Adicionar 10 mL de hidróxido de sódio 0,1 M. Extrair com seis porções de 25 mL de clorofórmio. Reunir os extratos clorofórmicos e reservá-los para o *Procedimento para a trimetoprima*. Transferir a solução aquosa para balão volumétrico de 200 mL e completar o volume com água. Transferir 5 mL da solução resultante para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água. Transferir 2 mL dessa solução para balão volumétrico de 50 mL, adicionar 4 mL de ácido clorídrico 0,5 M e 1 mL de nitrito de sódio a 0,1% (p/v). Deixar em repouso, em banho de gelo, durante 10 minutos. Adicionar 2 mL de sulfamato de amônio a 0,5% (p/v) e deixar em repouso durante 10 minutos. Adicionar 1 mL de dicloridrato de *N*-(1-naftil)etileno-diamina a 0,1% (p/v), deixar em repouso durante 10 minutos e completar o volume com água. Para o preparo da solução padrão, transferir 50 mg de sulfametoxazol SQR para balão volumétrico de 50 mL, contendo 2,5 mL de hidróxido de sódio 0,1 M, e completar o volume com água. Transferir 5 mL dessa solução para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água. Repetir o procedimento a partir de “Transferir 2 mL dessa solução para balão volumétrico de 50 mL...”. Medir as absorvâncias das soluções resultantes em 538 nm, utilizando água para ajuste do zero. Calcular a quantidade de sulfametoxazol ($C_{10}H_{11}N_3O_3S$) na suspensão oral a partir das leituras obtidas.

Procedimento para a trimetoprima: extrair a solução clorofórmica reservada no *Procedimento para sulfametoxazol* com quatro porções de 20 mL de ácido acético 1 M. Reunir os extratos aquosos, lavá-los com 5 mL de clorofórmio e diluí-los para 100 mL com ácido acético 1 M. Transferir 2 mL da solução para balão volumétrico de 50 mL, adicionar 5 mL de ácido acético 1 M e completar o volume com água, de modo a obter solução a 0,0016% (p/v). Preparar solução de trimetoprima SQR na mesma concentração, utilizando o mesmo solvente. Medir as absorvâncias das soluções resultantes em 271 nm, utilizando ácido acético 1 M para ajuste do zero. Calcular a quantidade de trimetoprima ($C_{14}H_{18}N_4O_3$) na suspensão oral a partir das leituras obtidas. Alternativamente, realizar os cálculos considerando $A(1\%, 1\text{ cm}) = 204$, em 271 nm.

B. Proceder conforme descrito no método **C.** de *Doseamento* na monografia de *Sulfametoxazol e trimetoprima comprimidos*. Preparar a *Solução amostra* como descrito a seguir.

Solução amostra: transferir volume da suspensão oral equivalente a 0,16 g de sulfametoxazol e 32 mg de trimetoprima para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 70 mL de metanol. Deixar em ultrassom durante 10 minutos, agitando ocasionalmente. Completar o volume com o mesmo solvente, homogeneizar e filtrar. Transferir 5 mL do filtrado para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com *Fase móvel*. Homogeneizar.

Procedimento: injetar, separadamente, 20 µL da *Solução padrão* e da *Solução amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de sulfametoxazol ($C_{10}H_{11}N_3O_3S$) e trimetoprima ($C_{14}H_{18}N_4O_3$) na suspensão oral a partir das respostas obtidas com a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados, protegidos da luz.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

SULFATO DE POTÁSSIO

Kalli sulfas

K_2SO_4 ; 174,26

sulfato de potássio; 08171

Sal de potássio do ácido sulfúrico (2:1)

[7778-80-5]

Contém, no mínimo, 99,0% de K_2SO_4 , em relação à substância dessecada.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Cristais incolores ou brancos ou pó cristalino, de sabor levemente salino.

Solubilidade. Solúvel em água, praticamente insolúvel em etanol.

IDENTIFICAÇÃO

A solução obtida em *Aspecto da solução* responde às reações do íon potássio e do íon sulfato (**5.3.1.1**).

ENSAIOS DE PUREZA

Aspecto da solução. Dissolver 1 g da amostra em 20 mL de água. A solução obtida é límpida (**5.2.25**) e incolor (**5.2.12**).

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

Substâncias insolúveis em água. Dissolver 10 g da amostra em 100 mL de água, em um béquer. Aquecer o béquer coberto em banho-maria até ebulição, durante 1 hora. Filtrar a solução em funil tarado de média porosidade (10 µm a 15 µm) e lavar com água quente. Dessecar a 105 °C, resfriar em dessecador e pesar. No máximo 0,01% (100 ppm).

Cloretos (5.3.2.1). Determinar em 1 g da amostra. Utilizar 1 mL de solução contendo 0,01 mg de cloreto (Cl), equivalente a 0,28 mL de ácido clorídrico padrão (HCl 0,01 M SV). No máximo 0,001% (10 ppm).

Metais pesados (5.3.2.3). No máximo 0,001% (10 ppm).

Perda por dessecação (5.2.9). Determinar em 1 g da amostra. Dessecar em estufa a 110 °C, durante 4 horas. No máximo 1,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA.

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Pesar, exatamente, cerca de 0,5 g da amostra, previamente dessecada, aquecer com 200 mL de água e 1 mL de ácido clorídrico. Adicionar, gradualmente, 8 mL de cloreto de bário SR aquecido à ebulição. Aquecer a mistura em banho-maria por 1 hora. Recolher o precipitado e lavar com água até que a última lavagem não se turve pela adição de nitrato de prata SR. Aquecer o precipitado entre 500 °C e 600 °C, aumentando a temperatura lentamente até obter sulfato de bário. Secar até peso constante. Cada g do resíduo equivale a 0,7466 g de K_2SO_4 .

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Catártico.

SULFATO DE SALBUTAMOL COMPRIMIDOS

Contém sulfato de salbutamol equivalente a, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 110,0% da quantidade declarada de salbutamol ($C_{13}H_{21}NO_3$).

IDENTIFICAÇÃO

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

B. Pesar e pulverizar os comprimidos. Agitar quantidade do pó equivalente a 2,5 mg de salbutamol com 50 mL de tetraborato sódico a 2% (p/v). Adicionar 1 mL de 4-aminoantipirina a 3% (p/v), 10 mL de ferricianeto de potássio a 2% (p/v) e 10 mL de clorofórmio. Agitar e deixar separar as camadas. A camada clorofórmica desenvolve coloração vermelho alaranjada.

C. Pesar e pulverizar os comprimidos. Utilizar quantidade do pó equivalente a 4 mg de salbutamol. Dissolver em 10 mL de água e filtrar. O filtrado responde às reações do íon sulfato (5.3.1.1).

CARACTERÍSTICAS

Determinação de peso (5.1.1). Cumpre o teste.

Teste de dureza (5.1.3.1). Cumpre o teste.

Teste de friabilidade (5.1.3.2). Cumpre o teste.

Teste de desintegração (5.1.4.1). Cumpre o teste.

Uniformidade de doses unitárias (5.1.6). Cumpre o teste.

TESTE DE DISSOLUÇÃO (5.1.5)

Meio de dissolução: água, 500 mL

Aparelhagem: pás, 50 rpm

Tempo: 30 minutos

Procedimento: após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução, acidificar com algumas gotas de ácido acético a 1% (v/v) e proceder conforme descrito em *Doseamento*. Preparar a *Solução padrão* como descrito a seguir.

Solução padrão: transferir quantidade de sulfato de salbutamol SQR, equivalente a 20 mg de salbutamol, para balão volumétrico de 250 mL, adicionar 150 mL de ácido acético a 1% (v/v). Deixar em ultrassom durante 15 minutos e completar o volume com água. Transferir 5 mL dessa solução para balão volumétrico de 100 mL e

completar o volume com água, obtendo solução a 4 µg de salbutamol por mililitro.

Injetar, separadamente, 100 µL da *Solução padrão* e da *Solução amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. Calcular a quantidade de salbutamol (C₁₃H₂₁NO₃) dissolvida no meio, a partir das respostas obtidas para a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.

Tolerância: não menos que 80% (Q) da quantidade declarada de salbutamol (C₁₃H₂₁NO₃) se dissolvem em 30 minutos.

ENSAIOS DE PUREZA

Substâncias relacionadas. Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada (5.2.17.1)*, utilizando sílica-gel GF₂₅₄ como suporte, e mistura de metilisobutilcetona, álcool isopropílico, acetato de etila, água e hidróxido de amônio (50:45:35:18:3), como fase móvel. Aplicar separadamente, à placa, 10 µL de cada uma das soluções, recentemente preparadas, descritas a seguir.

Solução (1): pesar e pulverizar os comprimidos. Transferir quantidade do pó equivalente a 48 mg de salbutamol para recipiente apropriado. Adicionar 60 mL de mistura de etanol e água (1:2) e, agitar mecanicamente por 30 minutos. Filtrar. Evaporar o filtrado até secar sob pressão reduzida em temperatura abaixo de 40 °C. Dissolver completamente o resíduo em 2 mL de água.

Solução (2): dissolver quantidade de sulfato de salbutamol SQR em água, para obter solução a 0,580 mg/mL, equivalente a 0,483 mg de salbutamol por mililitro.

Solução (3): dissolver quantidade de sulfato de salbutamol SQR em água, para obter solução a 0,218 mg/mL, equivalente a 0,183 mg de salbutamol por mililitro.

Solução (4): dissolver quantidade de sulfato de salbutamol SQR em água, para obter solução a 73 µg/mL, equivalente a 61 µg de salbutamol por mililitro.

Desenvolver o cromatograma. Remover a placa, deixar secar ao ar. Nebulizar com solução de cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona a 0,1% (p/v) em mistura de metanol e água (9:1). Em seguida nebulizar com ferricianeto de potássio amoniacal e, novamente, com a solução de cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona. Qualquer mancha secundária obtida com a *Solução (1)* não é maior em tamanho ou intensidade que a mancha obtida com a *Solução (2)* (2%). Qualquer outra mancha secundária obtida com a *Solução (1)* não é maior em tamanho e intensidade que a mancha principal obtida com a *Solução (3)* (0,75%). Não mais que duas manchas secundárias são iguais em tamanho e intensidade que as manchas obtidas com a *Solução (4)* (0,50%) A soma das intensidades de todas manchas secundárias obtidas na *Solução (1)* não deve ultrapassar 3,5%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*, utilizando cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 276 nm; coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm), mantida à temperatura ambiente; fluxo da *Fase móvel* de 1,5 mL/minuto.

Solução de hexanossulfonato de sódio: dissolver 0,95 g de 1-hexanossulfonato de sódio em 1000 mL de água. Adicionar 10 mL de ácido acético e homogeneizar.

Fase móvel: mistura de *Solução de hexanossulfonato de sódio* e metanol (60:40).

Diluyente: mistura de ácido acético a 1% (v/v) e metanol (60:40).

Solução amostra: pesar e pulverizar 20 comprimidos. Transferir quantidade do pó equivalente a 6 mg de salbutamol para balão volumétrico de 200 mL. Adicionar 150 mL de *Diluyente*. Deixar em ultrassom durante 15 minutos. Agitar mecanicamente por 45 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente, obtendo solução a 30 µg/mL. Homogeneizar e filtrar.

Solução padrão: transferir quantidade de sulfato de salbutamol SQR, equivalente a 12 mg de salbutamol, para balão volumétrico de 100 mL, adicionar 60 mL de *Diluyente* e deixar em ultrassom durante 15 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente. Transferir 25 mL dessa solução para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com o mesmo solvente obtendo solução a 30 µg de salbutamol por mililitro. Homogeneizar.

Injetar replicatas de 20 µL das soluções. A eficiência da coluna não deve ser menor que 800 pratos teóricos. O fator de cauda não é maior que 2,5. O desvio padrão relativo das áreas de replicatas dos picos registrados não deve ser maior que 2,0%.

Procedimento: injetar, separadamente, 20 µL da *Solução padrão* e da *Solução amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. Calcular a quantidade de salbutamol (C₁₃H₂₁NO₃) nos comprimidos a partir das respostas obtidas para a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados, ao abrigo da luz.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

SULFATO DE SÓDIO DECAIDRATADO

Natrii sulfas

$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; 322,19

sulfato de sódio decaidratado; 09841

Sal de sódio do ácido sulfúrico decaidratado (2:1:10)

[7727-73-3]

Contém, no mínimo 98,5% e, no máximo, 101,0% de Na_2SO_4 , em relação à substância dessecada.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó cristalino branco ou cristais transparentes incolores; sabor salino levemente amargo. Higroscópico.

Solubilidade. Facilmente solúvel em água e praticamente insolúvel em etanol.

IDENTIFICAÇÃO

A. A solução da amostra a 5% (p/v) em água responde aos testes para o íon sulfato (**5.3.1.1**).

B. A solução da amostra a 5% (p/v) em água responde aos testes para o íon sódio (**5.3.1.1**).

ENSAIOS DE PUREZA

Acidez ou alcalinidade. A 10 mL de uma solução contendo 1 g em 20 mL de água, adicionar uma gota de azul de bromotimol SI. São necessários, no máximo, 0,5 mL de ácido clorídrico 0,01 M ou 0,5 mL de hidróxido de sódio 0,01 M para mudar a cor da solução.

Cloretos (5.3.2.1). O equivalente a 1 g da amostra não apresenta mais cloretos do que o correspondente a 0,6 mL de ácido clorídrico 0,01 M SV. No máximo 0,02% (200 ppm).

Metais pesados (5.3.2.3). Dissolver quantidade da amostra equivalente a 2 g de sulfato de sódio

decaidratado em 10 mL de água. Adicionar 2 mL de ácido clorídrico 0,1 M e completar o volume para 25 mL. A solução satisfaz ao *Ensaio limite para metais pesados*. No máximo 0,001% (10 ppm).

Perda por dessecação (5.2.9). Secar durante quatro horas a 105 °C. A perda é de 51% a 57% do peso.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA.

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Pesar o equivalente a 0,4 g da amostra dessecada e dissolver em 200 mL de água. Adicionar 1 mL de ácido clorídrico. Aquecer até a ebulição e gradualmente, adicionar em pequenas porções, com agitação constante, excesso (cerca de 8 mL) de uma solução de cloreto de bário a 12% (p/v). Aquecer a mistura em banho-maria durante uma hora. Deixar decantar, filtrar o precipitado e lavar com água até que as águas de lavagem estejam livres de cloretos. Secar, calcinar e pesar. A massa de sulfato de bário obtida multiplicado por 0,6086 representa o equivalente de Na_2SO_4 .

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

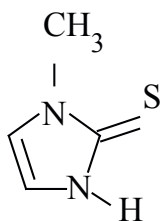
Em recipientes herméticos, com temperatura não superior a 30 °C.

ROTULAGEM

Observar legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Laxante.

TIAMAZOL**Thiamazolum**C₄H₆N₂S; 114,17

tiamazol; 08504

1,3-Diidro-1-metil-2*H*-imidazol-2-tiona

[60-56-0]

Contém, no mínimo, 98,0% e, no máximo 101,0% de C₄H₆N₂S, em relação à substância dessecada.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó cristalino branco ou levemente amarelado.

Solubilidade. Facilmente solúvel em água, cloreto de metileno e etanol.

Constantes físico-químicas.

Faixa de fusão (5.2.2): 143 °C a 146 °C.

IDENTIFICAÇÃO

A. O espectro de absorção no infravermelho (5.2.14) da amostra dessecada a 105 °C por 2 horas, e dispersa em brometo de potássio, apresenta máximo de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas daqueles observados no espectro de tiamazol SQR, preparado de maneira idêntica.

B. O espectro de absorção no ultravioleta (5.2.14), na faixa de 200 nm a 300 nm, de solução a 0,0005% (p/v) em solução de ácido sulfúrico a 0,28% (v/v), exibe máximos de absorção em 211 nm e em 251 nm. A razão entre os valores de absorvância medidos em 251 nm e 211 nm está compreendida entre 2,5 e 2,7.

C. Proceder conforme descrito em *Cromatografia em camada delgada* (5.2.17.1), utilizando sílica-gel GF₂₅₄, como suporte, e mistura de hidróxido de amônio, álcool isopropílico e tolueno (1:24:75) como fase móvel. Aplicar, separadamente, à placa 10 µL de cada uma das soluções recentemente preparadas descritas a seguir.

Solução (1): solução a 1 mg/mL da amostra em metanol.

Solução (2): solução a 1 mg/mL de tiamazol SQR em metanol.

Desenvolver o cromatograma. Remover a placa, deixar secar ao ar. Examinar sob luz ultravioleta (254 nm). A mancha no cromatograma obtido com a *Solução (1)*, corresponde em posição, cor e intensidade àquela do cromatograma obtido com a *Solução (2)*. Expor a placa ao vapor de iodo durante 30 minutos, o cromatograma apresenta dois pontos claramente separados.

ENSAIOS DE PUREZA

Substâncias relacionadas. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a gás* (5.2.17.5). Utilizar cromatógrafo a gás provido de detector de ionização de chamas, coluna capilar de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, preenchida com polidifenildimetilsiloxano com especial desativação para compostos básicos, com espessura do filme de 0,5 mm; temperatura da coluna de 100 °C a 250 °C (100 °C mantida durante 2 minutos após a injeção, aumentada a 250 °C de 2 a 7 minutos e mantida a 250 °C durante o período de 7 a 22 minutos), temperatura do injetor a 150 °C e temperatura do detector a 250 °C; utilizando hélio como gás de arraste e auxiliar à chama do detector; fluxo de 1,5 mL/minuto.

Solução amostra: solução a 10 mg/mL da amostra em clorofórmio.

Solução de referência (a): solução a 0,01 mg/mL da amostra em clorofórmio.

Solução de referência (b): dissolver 5 mg de 2,2-dimetoxi-N-metiletanamina SQR (*Impureza A*), 5 mg de 1-metil-1*H*-imidazol SQR (*Impureza B*) e 5 mg de 1-metil-2-(metilsulfanil)-1*H*-imidazol SQR (*Impureza C*) em clorofórmio até completar 50 mL. Transferir 1 mL dessa solução para um balão de 10 mL e completar o volume com clorofórmio.

Tendo como referência o tempo de retenção do tiamazol (6,5 minutos), o da *Impureza A* é 0,3; o da *Impureza B* é de 0,4 e o da *Impureza C* é de 0,7. Com fator de resolução mínimo de 1,5 entre os picos das *Impurezas A* e *B*.

Procedimento: injetar, separadamente, 1 µL da *Solução de referência (a)* e da *Solução de referência (b)*, utilizando divisão de fluxo de 3:20. Registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos correspondentes ao tiamazol. As áreas obtidas com as *Impurezas A, B* e *C* no cromatograma da *Solução de referência (a)* não são maiores do que as áreas correspondentes obtidas com a *Solução de referência (b)*. Nenhuma área de qualquer outra impureza é maior do que a área do pico principal obtido com a *Solução de referência (a)* (0,1%). A soma das áreas sob todos os picos, exceto a do pico principal, obtidos no cromatograma da *Solução de referência (a)*, não é maior que 5 vezes a área sob o pico principal (0,5%). Desconsiderar picos com área até 0,2 vezes a

área do pico principal no cromatograma obtido com a *Solução de referência (a)* (0,02%).

Selênio. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*. Preparar as soluções como descrito a seguir.

Solução de 2,3-diaminonaftaleno: dissolver 0,1 g de 2,3-diaminonaftaleno e 0,5 g de cloridrato de hidroxilamina em ácido clorídrico 0,1 M e completar o volume para 100 mL com o mesmo solvente. Preparar a solução no dia do ensaio.

Solução padrão: pesar, exatamente, cerca de 40 mg de selênio, dissolver em 100 mL de ácido nítrico diluído (1:2), se necessário aquecer em banho-maria para dissolver, transferir para balão volumétrico de 1000 mL com auxílio de água, completar o volume com água e homogeneizar. Transferir 5 mL dessa solução para balão volumétrico de 200 mL e completar o volume com água. Transferir 3 mL dessa solução para bquer de 150 mL, adicionar 25 mL de água e 25 mL de ácido nítrico diluído (1:30).

Solução amostra: com 0,1 g da amostra proceder conforme descrito em *Método de combustão (5.3.3.3)*, *Método do frasco de combustão em pressão atmosférica*, utilizando 25 mL de ácido nítrico diluído (1:30) como solução absorvedora. Concluída a combustão completa da amostra, lavar a tampa com pequena porção de água e transferir a solução para bquer, lavar o equipamento com 25 mL de água e juntá-la à solução anterior. Ferver suavemente por 10 minutos e esfriar até a temperatura ambiente.

Solução branco: misturar 25 mL de água e 25 mL de ácido nítrico diluído (1:30).

Procedimento: transferir a *Solução amostra*, a *Solução padrão* e a *Solução branco* para béqueres separados, ajustar o pH em $2,0 \pm 0,2$ com solução de hidróxido de amônio (1:2) e completar a volume para 60 mL com água. Transferir cada solução para funil de separação âmbar. Lavar cada bquer com 10 mL de água e juntar a cada funil de separação respectivamente. Acrescentar 0,2 g de cloridrato de hidroxilamina, agitar suavemente para solubilizar. Adicionar imediatamente 5 mL de *Solução de 2,3-diaminonaftaleno*, agitar e deixar em repouso por 100 minutos. Adicionar 5 mL de cicloexano em cada funil de separação, agitar durante 2 minutos e separar as fases. Centrifugar os extratos de cicloexano para remover qualquer água remanescente. Determinar as absorvâncias dos extratos de cicloexano da *Solução padrão* e da *Solução amostra* em 378 nm. Utilizar extrato de cicloexano da *Solução branco* como branco. A absorvância da *Solução amostra* não é maior que a da *Solução padrão*.

Metais pesados (5.3.2.3). Utilizar o *Método I*. Realizar o teste com 12 mL da solução obtida em *Aspecto da solução*. Preparar solução padrão utilizando *Solução padrão de chumbo diluída (1 ppm Pb)*. No máximo 0,001% (10 ppm).

Perda por dessecação (5.2.9). Determinar em 1 g da amostra, em estufa a 105 °C por 2 horas. No máximo 0,5%.

Cinzas Sulfatadas (5.2.10). Determinar em 1 g de amostra. No máximo 0,1%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA.

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Pesar, exatamente, cerca de 0,25 g da amostra, dissolver em 75 mL de água. Adicionar 15 mL de hidróxido de sódio 0,1 M SV e misturar. Adicionar sob agitação 30 mL de nitrato de prata 0,1 M e 1 mL de azul de bromotimol SI. Titular com hidróxido de sódio 0,1 M SV até coloração azul esverdeado permanente. Cada mL de hidróxido de sódio 0,1 M SV equivale a 11,417 mg de $C_4H_6N_2S$.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes protegidos da luz.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Inibidor da síntese de hormônios tireoidianos.

TINZAPARINA SÓDICA

Tinzaparinum natricum

A tinzaparina sódica é um sal sódico de heparina de baixo peso molecular obtida por despolimerização enzimática controlada da heparina de mucosa intestinal suína, utilizando-se a heparinase de *Flavobacterium heparinum*. A maioria dos componentes possuem uma estrutura do ácido 2-O-sulfo-4-enepiranosurônico na região da extremidade não redutora e uma 2N,6-O-disulfo-D-glucosamina na região da extremidade redutora da cadeia.

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

A massa molecular média relativa varia de 5500 Da a 7500 Da, com um valor característico próximo de 6500 Da. O grau de sulfatação é de 1,8 a 2,5 por unidade dissacarídica. A potência não deve ser inferior a 70 UI nem superior a 120 UI de atividade antifator Xa por miligrama, calculado em relação à substância dessecada. A razão da atividade antifator Xa pela a atividade antifator IIa é entre 1,5 e 2,5.

IDENTIFICAÇÃO

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

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

C. Proceder conforme descrito no teste **C.** de *Identificação* da monografia *Heparina de baixo peso molecular*. Os seguintes requisitos se aplicam: a massa molecular média relativa varia de 5500 Da a 7500 Da; a porcentagem em massa das cadeias inferiores a 2000 Da não é maior do que 10%; a porcentagem de cadeias com peso molecular entre 2000 Da e 8000 Da pode variar no máximo entre 60% e 72%; a porcentagem de cadeias com peso molecular acima de 8000 Da pode variar de 22% a 36%.

CARACTERÍSTICAS

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

ENSAIOS DE PUREZA

Absorvância específica. 8,0 a 12,5 em relação à substância dessecada, determinada a 231 nm. Dissolver 50 mg da amostra em 100 mL de ácido clorídrico 0,01 M.

TRETINOÍNA

Tretinoinum

$C_{20}H_{28}O_2$; 300,44

tretinoína; 08848

Ácido retinóico

[302-79-4]

Contém, no mínimo, 97,0% e, no máximo, 103,0% de $C_{20}H_{28}O_2$, em relação à substância dessecada.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó cristalino, amarelo ou laranja claro.

Solubilidade. Praticamente insolúvel em água, solúvel em clorofórmio e metanol, pouco solúvel em éter etílico, muito pouco solúvel em etanol.

Constantes físico-químicas.

Temperatura de fusão (5.2.2): funde a 182 °C, com decomposição.

IDENTIFICAÇÃO

Nota: proceder às análises ao abrigo da luz direta e empregar vidraria âmbar.

A. O espectro de absorção no infravermelho (5.2.14) da amostra dispersa em brometo de potássio, previamente dessecada, apresenta máximos de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas daqueles observados no espectro de tretinoína SQR, preparado de maneira idêntica.

B. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtida no método **B.** de *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Solução padrão*.

ENSAIOS DE PUREZA

Substâncias relacionadas e Limite de Isotretinoína. Proceder conforme descrito no método **B.** de *Doseamento*. Preparar as *Soluções (1), (2), (3), (4), e (5)* como descrito a seguir.

Solução (1): transferir 0,1 g da amostra, exatamente pesados, para balão volumétrico de 50 mL, dissolver com metanol e completar o volume com o mesmo solvente.

Solução (2): transferir 10 mg de isotretinoína SQR, exatamente pesados, para balão volumétrico de 10 mL, dissolver com metanol e completar o volume com o mesmo solvente.

Solução (3): transferir 1 mL da *Solução (2)* para balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com metanol.

Solução (4): transferir 1 mL da *Solução (2)* e 0,5 mL da *Solução (1)* para balão volumétrico de 25 mL, misturar e completar o volume com metanol.

Solução (5): transferir 0,5 mL da *Solução (1)* para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com metanol.

Procedimento: injetar separadamente 10 µL de cada uma das *Soluções (1), (2), (3), (4) e (5)*. O desvio padrão da área do pico principal não deve ser maior que 2% em duas injeções sucessivas. Na *Solução (4)* a resolução entre tretinoína e isotretinoína não pode ser menor que 2.

No cromatograma obtido com a *Solução (1)* a área do pico exato da isotretinoína não pode ser maior que a área do pico principal obtido no cromatograma da *Solução (3)* (2%) e a área resultante da soma das áreas de todos os picos obtidos na *Solução (1)*, com exceção dos picos da tretinoína, do solvente e do pico da isotretinoína, não pode ser maior que a área do pico principal obtido com a *Solução (5)* (correspondente ao limite máximo de 0,5% permitido de impurezas).

Metais pesados (5.3.2.3). Utilizar *Método I*. No máximo 0,002% (20 ppm).

Perda por dessecação (5.2.9). Determinar em 1 g de amostra, à temperatura ambiente, sob pressão reduzida, por 16 horas até peso constante. No máximo 0,5%.

Cinzas sulfatadas (5.2.10). Determinar em 1 g de amostra. No máximo 0,1%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA.

Contagem do número total de micro-organismos mesófilos (5.5.3.1.2). Cumprir o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumprir o teste.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Pesas, exatamente, cerca de 0,2 g da amostra e dissolver em 70 mL de acetona. Titular com hidróxido de tetrabutylamônio 0,1 M SV. Determinar o ponto final potenciométricamente. Cada mL de hidróxido de tetrabutylamônio 0,1 M SV equivale a 30,044 mg de $C_{20}H_{28}O_2$.

B. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar

cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 353 nm; coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (10 µm), mantida a temperatura ambiente; fluxo da *Fase móvel* de 1,0 mL/minuto. Realizar a análise ao abrigo da luz direta.

Fase móvel: metanol e água (77:23), com 0,5% (v/v) de ácido acético glacial; se necessário, ajustar para obter um tempo de retenção para a tretinoína em torno de 18 minutos.

Solução amostra: dissolver quantidade exatamente pesada da amostra em metanol para obter solução a 0,4 mg/mL. Transferir 5 mL dessa solução para balão volumétrico âmbar de 50 mL e completar o volume com metanol, obtendo solução a 40 µg/mL.

Solução padrão: dissolver quantidade exatamente pesada de tretinoína SQR em metanol para obter solução a 0,4 mg/mL. Transferir 5 mL dessa solução para balão volumétrico âmbar de 50 mL e completar o volume com metanol, obtendo solução a 40 µg/mL.

Procedimento: injetar separadamente 20 µL da *Solução padrão* e da *Solução amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular o teor de $C_{20}H_{28}O_2$ na amostra a partir das respostas obtidas com a *Solução padrão* e com a *Solução amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes herméticos, protegidos da luz, temperatura não excedendo 25 °C.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA

Queratolítico.

VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS E HAEMOPHILUS INFLUENZAE b (CONJUGADA)

Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis adsorbatum et haemophili stirpe b conjugatum

A vacina adsorvida difteria, tétano, pertussis e *Haemophilus influenzae* b (conjugada) é uma vacina combinada composta de anatoxinas diftérica e tetânica e suspensão de células inteiras mortas de *Bordetella pertussis* e poliribosil-ribitol fosfato (PRP) purificado

de *Haemophilus influenzae* b covalentemente ligado a uma proteína carreadora, diluídas em solução salina tamponada e adsorvidas pelo hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, podendo conter um conservante. O produto pode ser apresentado como uma preparação líquida tetravalente no mesmo frasco ou com o componente *Haemophilus influenzae* b liofilizado em frasco-ampola, o qual é reconstituído, imediatamente antes do uso, pela vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis.

Componente diftérico: a anatoxina diftérica purificada cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

Componente tetânico: a anatoxina tetânica purificada cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*.

Componente pertussis: a vacina pertussis cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*.

Componente polissacarídeo: cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

Nos ensaios de potência na vacina combinada, pode ser utilizada, como referência, uma vacina combinada ou cada um dos seus antígenos em separado. Caso isso não seja possível devido à interação entre os componentes da vacina combinada ou diferença na composição entre a vacina de referência monocomponente e a vacina sob teste, um lote de vacina combinada que tenha mostrado efetividade em estudo clínico ou então um lote representativo é usado como vacina de referência. Na produção de um lote representativo é necessário seguir rigorosamente o processo de produção utilizado para o lote testado em estudo clínico. A vacina de referência pode ser estabelecida por um método adequado que não interfere no procedimento do ensaio.

As vacinas produto acabado a granel são preparadas separadamente, sendo uma delas pela adsorção, em compostos de alumínio, de quantidades determinadas de anatoxinas diftérica e tetânica, células inteiras mortas de *B. pertussis* e a outra com o componente *Haemophilus influenzae* b. O produto também pode ser formulado pela adsorção, em compostos de alumínio, de quantidades determinadas de anatoxinas diftérica e tetânica, células inteiras mortas de *B. pertussis* e PRP conjugado. Um conservante adequado pode ser adicionado no produto. Antes do envase, amostras do produto são submetidas aos controles de esterilidade, pH, toxicidade específica para pertussis, formaldeído residual, preservativo antimicrobiano, alumínio, determinação de atividade imunogênica para os componentes diftérico, tetânico, pertussis e polissacarídeo residual.

Os produtos são envasados em recipientes adequados, rotulados e submetidos aos controles requeridos.

As vacinas preparadas como produto acabado a granel, assim como envasadas, separadamente, uma delas contendo os componentes diftérico, tetânico e pertussis e a outra o componente *Haemophilus influenzae* b, devem estar de acordo com as respectivas monografias de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis* e *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

IDENTIFICAÇÃO

Dissolver a amostra da vacina adsorvida com citrato de sódio a pH 9,0 para obter solução a 10% (p/v). Manter a 37 °C durante aproximadamente 16 horas e centrifugar. Utilizar o líquido sobrenadante para identificar cada um dos componentes, diftérico ou tetânico. Ressuspender o precipitado para identificar o componente pertussis. Outros métodos adequados podem ser utilizados para separação do adjuvante.

Componente diftérico. Cumpre os testes de *Identificação* para *Componente diftérico* descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

Componente tetânico. Cumpre os testes de *Identificação* descritos na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*.

Componente pertussis. Cumpre os testes de *Identificação* para *Componente pertussis* descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*.

Componente Haemophilus influenzae b. Cumpre os testes de *Identificação* descritos na monografia de *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra da vacina líquida tetravalente ou, no caso do componente haemophilus liofilizado, o pH deve ser determinado após a reconstituição com o diluente adequado. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Cumpre os testes descritos em *Ensaio físico-químico* das monografias *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)* e *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Cumpre os testes descritos em *Testes de segurança biológica* das monografias *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)* e *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*.

DOSEAMENTO**Componente diftérico**

Cumpra o *Doseamento* descrito na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente tetânico

Cumpra o *Doseamento* descrito na monografia de *Toxoide tetânico adsorvido*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente pertussis

Cumpra o *Doseamento* descrito na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente *Haemophilus influenzae* b

Cumpra o *Doseamento* descrito na monografia de *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

**VACINA ADSORVIDA DIFTERIA,
TÉTANO, PERTUSSIS, HEPATITE B
(RECOMBINANTE) E HAEMOPHILUS
INFLUENZAE b (CONJUGADA)**

**Vaccinum diphtheriae, tetani, pertussis,
hepatitidis B adsorbatum et haemophili
stirpe b conjugatum**

A vacina adsorvida difteria, tétano, pertussis, hepatite B (recombinante) e *Haemophilus influenzae* b (conjugada) é uma vacina combinada composta de anatoxinas diftérica e tetânica, suspensão de células inteiras mortas de *Bordetella pertussis*, suspensão de

antígeno (HBsAg) purificado da superfície do vírus da hepatite B, poliribosil-ribitol fosfato (PRP) purificado de *Haemophilus influenzae* b covalentemente ligado a uma proteína carreadora, diluídas em solução salina tamponada e adsorvidas pelo hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, podendo conter um conservante. O produto pode ser apresentado com o componente *Haemophilus influenzae* b em um frasco-ampola separado, o qual é misturado aos outros componentes da vacina imediatamente antes do uso.

Componente diftérico: a anatoxina diftérica purificada cumpre as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

Componente tetânico: a anatoxina tetânica purificada cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Toxoide tetânico adsorvido*.

Componente pertussis: a vacina pertussis cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*.

Componente hepatite B: a vacina hepatite B cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Vacina hepatite B (recombinante)*.

Componente Polissacarídeo: cumpre com as especificações de produção e controles, descritos na monografia de *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

Se a vacina é apresentada com o componente *Haemophilus influenzae* b em frasco-ampola separado, os ensaios realizados nos componentes difteria, tétano, pertussis e hepatite B devem mostrar consistência em um número adequado de lotes da vacina combinada reconstituída antes do uso. Para controles de rotina subsequentes, os testes realizados nesses componentes devem ser desenvolvidos sem a mistura com o componente *Haemophilus influenzae* b.

Nos ensaios de potência na vacina combinada pode ser utilizada, como referência, uma vacina combinada ou cada um dos seus antígenos em separado. Caso isso não seja possível devido à interação entre os componentes da vacina combinada ou diferença na composição entre a vacina de referência monocomponente e a vacina sob teste, um lote de vacina combinada que tenha mostrado efetividade em estudo clínico ou então um lote representativo é usado como vacina de referência. Na produção de um lote representativo é necessário seguir rigorosamente o processo de produção utilizado para o lote testado em estudo clínico. A vacina de referência pode ser estabelecida por um método adequado que não interfere no procedimento do ensaio.

As vacinas produto acabado a granel são preparadas separadamente, sendo uma delas pela adsorção, em compostos de alumínio, de quantidades determinadas de anatoxinas diftérica e tetânica, células inteiras mortas de *B. pertussis* e hepatite B (recombinante) e a

outra com o componente *Haemophilus influenzae* b. O produto também pode ser formulado pela adsorção, em compostos de alumínio, de quantidades determinadas de anatoxinas diftérica e tetânica, células inteiras mortas de *B. pertussis*, PRP conjugado e hepatite B (recombinante). Um preservativo antimicrobiano adequado pode ser adicionado no produto. Antes do envase, amostras do produto são submetidas aos controles de esterilidade, pH, toxicidade específica para pertussis, formaldeído residual, preservativo antimicrobiano, alumínio, determinação de atividade imunogênica para os componentes diftérico, tetânico, pertussis, hepatite B e polissacarídeo residual.

Os produtos são envasados em recipientes adequados, rotulados e submetidos aos controles requeridos.

As vacinas preparadas como produto acabado a granel, assim como envasadas, separadamente, uma delas contendo os componentes diftérico, tetânico, pertussis e hepatite B, e a outra o componente *Haemophilus influenzae* b, devem estar de acordo com as respectivas monografias de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*, *Vacina hepatite B (recombinante)* e *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

IDENTIFICAÇÃO

Dissolver a amostra da vacina adsorvida com citrato de sódio a pH 9,0 para se obter solução a 10% (p/v). Manter a 37 °C por aproximadamente 16 horas e centrifugar. Utilizar o líquido sobrenadante para identificar cada um dos componentes, diftérico ou tetânico. Ressuspender o precipitado para identificar o componente pertussis. Outros métodos adequados podem ser utilizados para separação do adjuvante.

Componente diftérico. Cumpre a *Identificação* descrita na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*.

Componente tetânico. Cumpre a *Identificação* descrita na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*.

Componente pertussis. Cumpre a *Identificação* descrita na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*.

Componente hepatite B. Cumpre a *Identificação* descrita na monografia de *Vacina hepatite B (recombinante)*.

Componente *Haemophilus influenzae* b. Cumpre os testes de *Identificação* descritos na monografia de *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra da vacina líquida pentavalente ou, no caso do componente haemophilus liofilizado, o pH deve ser determinado após a reconstituição com o diluente adequado. Os limites

devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Realizar os ensaios requeridos em *Ensaio físico-químico*, descritos nas monografias *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*, *Vacina hepatite B (recombinante)* e *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Realizar os ensaios requeridos em *Testes de segurança biológica*, descritos nas monografias *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*, *Vacina hepatite B (recombinante)* e *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*.

DOSEAMENTO

Componente diftérico

Cumpre o *Doseamento* descrito na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente tetânico

Cumpre o *Doseamento* descrito na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente pertussis

Cumpre o *Doseamento* descrito na monografia de *Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente hepatite B

Cumpre o *Doseamento* descrito na monografia de *Vacina hepatite B (recombinante)*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Componente *Haemophilus influenzae* b

Cumpre o *Doseamento* descrito na monografia de *Vacina Haemophilus influenzae b (conjugada)*. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpre o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA HAEMOPHILUS INFLUENZAE b (CONJUGADA)

Vaccinum haemophili stirpe b conjugatum

A vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada) é uma preparação líquida ou liofilizada de polissacarídeo capsular, obtido a partir de uma cepa de *Haemophilus influenzae* tipo b, covalentemente ligado a uma proteína carreadora.

O polissacarídeo de ribosil-ribitol-5-fosfato (PRP) é um polímero composto de unidades alternadas de ribose e ribitol, covalentemente agrupadas por um fosfato por meio de ligações de fosfatodiesté. A proteína carreadora, quando conjugada ao polissacarídeo, é capaz de induzir uma resposta imunológica dependente de célula-T.

A produção do polissacarídeo tipo B é baseada no sistema de lote semente, que é uma quantidade de ampolas contendo *H. influenzae* tipo b liofilizado, de composição uniforme, obtido a partir de uma cepa liofilizada de procedência conhecida. Os meios de cultura utilizados para preservar a viabilidade da cepa liofilizada, ou congelada, não devem ser constituídos de proteínas de origem animal. É recomendado que o PRP produzido pelo lote semente seja caracterizado por espectrometria de ressonância magnética nuclear.

O micro-organismo *H. influenzae* tipo b é cultivado em um meio líquido, adequado que não contém polissacarídeos de alto peso molecular. Se algum componente do meio contiver substâncias originárias do sangue, o processo deve ser validado para comprovar que após a purificação elas não são detectadas. Ao final do cultivo verifica-se a pureza da cultura por exame microscópico, inoculação da amostra em meios de cultivo adequados e aglutinação da cultura com anti-soro específico. A cultura pode ser inativada. O PRP é separado do meio de cultivo e purificado por um método adequado.

POLISSACARÍDEO HAEMOPHILUS INFLUENZAE (PRP)

O polissacarídeo purificado somente pode ser utilizado na preparação do conjugado se cumprir os seguintes requisitos.

Identificação. O PRP é identificado por um *Método imunoquímico* (5.6) ou outro método validado, como espectrometria por ressonância magnética nuclear.

Umidade. O teor de umidade do polissacarídeo é determinado por análise termogravimétrica em balança de lâmpada halógena. A perda de peso é determinada em

uma amostra seca a 60°C durante 60 minutos. Transferir 120 mg da amostra para naveta, programar o analisador de umidade e, após o término da análise, transferir quantitativamente a amostra para um balão volumétrico de 10 mL e adicionar água ultrapurificada.

Distribuição por tamanho molecular. Corresponde a porcentagem de PRP, eluído antes de um dado valor de coeficiente de distribuição (Kd) ou dentro de uma faixa de valores de Kd. A distribuição das dimensões moleculares do PRP pode ser determinada por *Cromatografia líquida de alta eficiência* (5.2.17.4) de exclusão por tamanho. O método é realizado usando-se coluna de gel filtração de 300 x 7,8 mm para partículas de 10 µm, com fluxo de *Fase móvel* de 0,3 mL/min. As colunas são mantidas a uma temperatura constante de 25 °C. A eluição é monitorada usando-se um detector refractométrico para análise de PRP.

Fase móvel: preparar solução de cloreto de sódio 0,2 M e trometamina 0,01 M. Homogeneizar e, se necessário, ajustar para o pH 7,0. Filtrar através de um filtro de membrana de 0,45 µm antes do uso.

Solução de PRP: preparar solução de PRP a 4 mg/mL em *Fase móvel*.

Injetar 100 µL de amostras da solução de polissacarídeo a cada 60 minutos.

Para análise dos dados, é necessária a determinação do volume de exclusão total (V_0) e do volume de inclusão total (V_t). O V_0 e o V_t são determinados, respectivamente, com dextrana com peso molecular próximo a $K_d = 0,3$ e azida sódica.

Os polissacarídeos contêm uma fração de alto peso molecular eluindo no volume morto. O volume de eluição desses polissacarídeos de alto peso molecular, também, pode ser usado para determinar o volume morto da coluna. Na determinação da distribuição de peso molecular, o valor de Kd é determinado pela equação:

$$Kd = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

ou
$$Kd = \frac{Rt(V_e) - Rt(V_0)}{Rt(V_t) - Rt(V_0)}$$

em que

Rt (Ve) = tempo de retenção do polissacarídeo analisado;

Rt (Vo) = tempo de retenção de Vo;

Rt (Vt) = tempo de retenção de Vt.

Para calcular a quantidade de polissacarídeo eluído a um $K_d \leq 0,30$, o volume de eluição correspondente a um $K_d = 0,30$ é determinado segundo a expressão:

$$V_e = [3,0(V_t - V_0)] + V_0$$

Com o valor de V_e , a porcentagem de polissacarídeo eluído a $K_d \leq 0,30$ é então determinada marcando esse valor no cromatograma e integrando a área do pico até esse ponto.

Um valor aceitável é estabelecido, especificamente, para o produto e cada partida de PRP deve cumprir com esse limite. Os limites para produtos aprovados, utilizando as fases estacionárias indicadas, são registrados, para informação, na **Tabela 1**.

O método de *Cromatografia líquida (5.2.17.4)* de detecção por espalhamento de luz também pode ser utilizado.

Outros métodos validados, como determinação do grau de polimerização ou do peso molecular médio e a dispersão das massas moleculares, podem substituir o teste para *Distribuição por tamanho molecular* descrito.

Concentração de PRP. A concentração de PRP é determinada por *Método imunológico (5.6)*, *Cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (5.2.17.3)* ou Ribose por espectrofotometria (Orcinol). Se for utilizado o teor de ribose, proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*.

Solução padrão de D-ribose: diluir D-ribose em água destilada para a obtenção de uma solução a 25 µg/mL. Distribuir e armazenar as alíquotas a -20 °C.

$$\% \text{ D - ribose} = \frac{\text{massa de D - ribose (} \mu\text{g) obtida da curva padrão}}{\text{massa de polissacarídeo (} \mu\text{g)}} \times 100$$

O limite mínimo deve estar de acordo com o registro do produto aprovado pela autoridade regulatória nacional.

Fósforo. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*. O método pode ser baseado na medida espectrofotométrica da absorbância da coloração azul formada pela redução de um complexo fosfomolibdico pelo ácido ascórbico.

Solução padrão: dissolver 109,7 mg de fosfato de potássio monobásico em 250 mL de água destilada. Diluir 5 mL da solução anterior para 100 mL com água destilada.

Solução A: pesar 2,5 g de molibdato de amônio e adicionar 100 mL de água destilada.

Solução B: no momento do uso, pesar 10 g de ácido ascórbico e adicionar 100 mL de água destilada.

Solução C (Complexo fosfomolibdico e ácido ascórbico): no momento do uso, misturar as soluções na seguinte ordem: 1 volume de ácido sulfúrico 3 M, 1 volume de *Solução A*, 2 volumes de água destilada e 1 volume de *Solução B*.

Solução A: pesar, exatamente, cerca de 50 mg de cloreto de ferro hexa-hidratado e dissolver em 100 mL de ácido clorídrico concentrado.

Reagente de orcinol: pesar 375 mg de orcinol monoidratado e dissolver em 5 mL de etanol a 96% (v/v). Misturar à *Solução A* na proporção de 1:20.

O polissacarídeo Hib é um polímero de ribosil-ribitol-5-fosfato e pode ser quantificado medindo-se o teor de ribose. A determinação do teor de ribose baseia-se na medição espectrofotométrica da absorbância de um complexo de coloração verde, formado pela reação entre o *Reagente de orcinol* e a ribose nas subunidades do polímero. Dentro da faixa da análise, a absorbância é proporcional à concentração de ribose. Para a curva analítica, pipetar, para cada um de 5 tubos de ensaio, 0 µL, 100 µL, 200 µL, 300 µL e 400 µL de *Solução padrão de D-ribose*. Adicionar água destilada a cada um dos tubos até 400 µL. Para a análise, dissolver o polissacarídeo purificado para 0,05 mg/mL em água destilada e pipetar 400 µL da solução amostra para os tubos. Adicionar a cada tubo 800 µL de *Reagente de orcinol* e colocá-los a 100 °C por 20 minutos. Deixar esfriar à temperatura ambiente e ler a absorbância a 669 nm. Os teores de ribose das amostras obtidas da curva analítica são expressos em microgramas de ribose por mililitro *versus* a massa do polissacarídeo seco. Calcular o porcentual (p/p) de D-ribose de acordo com a expressão:

Reativo de mineralização: 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 5 mL de ácido perclórico a 70% (p/p).

Dissolver 25 mg de polissacarídeo purificado em 50 mL de água destilada. Para a mineralização, pipetar 100 µL dessa solução em um tubo de ensaio e adicionar 100 µL de *Reativo de mineralização*. O teste é realizado em triplicata. Aquecer a 250 °C até que haja descoloração completa (4 horas). O branco (1 mL de água destilada) e as soluções padrão (0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL e 2,0 mL de *Solução padrão*) são tratados de forma idêntica. Para o desenvolvimento de coloração, após esfriar cada tubo, adicionar 4 mL de *Solução C*. Aquecer o conteúdo dos tubos a 37 °C por 120 minutos para desenvolver uma coloração azul do complexo fosfomolibdico. Medir a absorbância das soluções amostras e padrões a 825 nm utilizando o branco como célula de referência. O teor de fósforo da amostra é determinado utilizando-se uma curva de calibração estabelecida a partir dos valores obtidos para as soluções padrão. Calcular o porcentual de fósforo através da fórmula:

$$\% \text{ de fósforo} = \frac{\text{concentração da amostra obtida na curva padrão (i g/tubo)}}{0,1 \times \text{concentração da amostra (i g de polissacarídeo seco/mL)}} \times 100$$

Os limites devem estar de acordo com o registro do produto aprovado pela autoridade regulatória nacional.

Proteína. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*. O ensaio sugerido é baseado no método de Lowry, em que há desenvolvimento da coloração azul do quelato de cobre em presença de proteínas.

Solução estoque padrão de albumina de soro bovino: pesar 20 mg de albumina bovina (BSA) e completar para 100 mL com água destilada.

Solução alcalina de cobre: misturar 0,5 mL de tartarato de sódio e potássio a 2% (p/v) em água destilada, com 0,5 mL de sulfato cúprico penta-hidratado a 1% (p/v) em água destilada. Ajustar para 50 mL com carbonato de sódio a 2% (p/v) em hidróxido de sódio 0,1 M.

Reagente Folin diluído: misturar 50 mL de reagente fosfomolibdotúngstico (reagente de Folin-Ciocalteu-

fenol) com 50 mL de água destilada. Esta solução tem de ser preparada no momento do uso.

Em tubos de ensaio adicionar 0 µL, 10 µL, 25 µL, 50 µL 100 µL e 200 µL da *Solução estoque padrão de albumina de soro bovino*. Ajustar o volume em cada tubo para 200 µL com água destilada. Se necessário, diluir as amostras contendo cerca de 10 mg/mL de polissacarídeo dessecado e adicionar 200 µL em cada tubo. Adicionar 200 µL de água destilada como solução branco. Adicionar aos tubos de soluções padrão, branco e amostra na seguinte ordem: 1 mL de *Solução alcalina de cobre*, misturar e deixar reagir por 10 minutos; 100 µL de *Reagente Folin diluído*, misturando imediatamente. Após 30 minutos, as soluções são centrifugadas e as absorvâncias das soluções padrão e das soluções amostra são medidas a 750 nm. A concentração de proteína na amostra é expressa como microgramas por mililitro. Calcular a porcentagem de proteína de acordo com a expressão:

$$\% \text{ de proteína} = \frac{\text{concentração obtida da curva padrão (i g/tubo)}}{\text{concentração da amostra (i g de polissacarídeo seco/mL)}} \times 100$$

No máximo 1% (p/p), calculado em relação à base seca.

Ácido nucleico. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria no ultravioleta (5.2.14)*. O ácido nucleico residual de uma amostra contendo pelo menos

1 mg/mL de polissacarídeo dessecado é medido por espectrofotometria de absorção no ultravioleta em 260 nm. A absorvância de uma solução de ácido nucleico aquoso a 10 g/L em uma célula espectrofotométrica de 1 cm de largura a 260 nm é de 200.

$$\% \text{ de ácido nucleico} = \frac{\text{leitura da amostra} \times 50}{\text{massa de polissacarídeo seco (mg)}} \times 100$$

No máximo 1% (p/p), calculado em relação à base seca.

Reagentes residuais. Quando for relevante, devem ser realizados testes para determinar resíduos de reagentes utilizados durante a inativação e purificação. Um valor aceitável para cada reagente é estabelecido especificamente para o produto e cada partida de PRP deve cumprir com esse limite. Caso os métodos para remoção de um reagente residual tenham sido validados, o teste no PRP pode ser omitido.

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo 10 UE/µg de PRP.

PROTEÍNA CARREADORA

A proteína carreadora, quando conjugada ao PRP, deve ser capaz de induzir uma atividade imunogênica adequada. As proteínas são produzidas por meio da cultura dos respectivos microrganismos, na qual é verificada a pureza bacteriana. O cultivo pode ser inativado e a proteína é purificada por métodos

adequados. As proteínas aprovadas e seus respectivos métodos de conjugação são informados na **Tabela 1**.

Componente diftérico. A anatoxina diftérica é produzida como descrito na monografia de *Vacina adsorvida difteria e tétano infantil*. Cumpre com os requisitos para anatoxina diftérica purificada, exceto para o teste de esterilidade, o qual não é requerido.

Componente tetânico. A anatoxina tetânica é produzida como descrito na monografia de *Toxóide tetânico adsorvido*. Cumpre com os requisitos para anatoxina tetânica purificada, exceto para o teste de esterilidade, o qual não é requerido.

Proteína diftérica CRM 197. Contém, no mínimo, 90% de proteína diftérica CRM 197, determinada por um método adequado. Alguns testes devem ser realizados, para validação ou rotineiramente, para demonstrar ausência de toxicidade no produto.

A proteína a ser utilizada na conjugação deve cumprir com os seguintes requisitos.

No caso de se utilizar como proteína carreadora o complexo proteico da membrana externa de *Neisseria meningitidis* grupo B (OMP), proceder ao teste de

Pirogênios (5.5.2.1). Injetar em cada coelho 0,25 µg de OMP por quilograma de peso corpóreo.

Tabela 1 – Características do produto e especificações para o PRP e proteína carreadora.

Carreador			Polissacarídeo Haemophilus		Conjugação	
Tipo	Pureza	Quantidade nominal por dose	Tipo de PRP	Quantidade nominal por dose	Método de conjugação	Procedimento
Anatoxina Diftérica	Maior do que 1500 Lf/mg de nitrogênio	18 µg	PRP de peso reduzido Kd:0,6-0,7	25 µg	Ativação do PRP por brometo de cianogênio	Anatoxina diftérica ativada (D-AH ⁺), ativação do PRP por brometo de cianogênio
Anatoxina Tetânica	Maior do que 1500 Lf/mg de nitrogênio	20 µg	PRP ≥ 50% Kd ≤ 0,30	10 µg	Mediada por carbodiimida	PRP ativado-HA (PRP-cov.-HA) + Anatoxina Tetânica + EDAC
Proteína Diftérica CRM 197	Maior do que 90% de proteína diftérica	25 µg	PRP de peso reduzido Dp=15-35 ou 10-35	10 µg	Aminação redutora (método de 1 passo) ou ativação por N-hidroxisuccinimida	Conjugação direta do PRP com a proteína CRM 197 ativação cianoborohidrida
Membrana proteica externa de Meningococos grupo B (OMP)	Vesículas proteicas da membrana externa: ≤ 8% de lipopolissacarídeo	125 µg ou 250 µg	PRP de peso reduzido Kd ≤ 0,6, usando agarose de ligação cruzada para cromatografia R ou M _w > 50 x 10 ³	7,5 ou 15 µg	Ligação tioéter	Ativação do PRP por CDI PRP-IM + BuA2 + BrAc = PRP-BuA2-BrAc + OMP tioativada

O PRP é modificado quimicamente para permitir a conjugação, sendo parcialmente despolimerizado antes ou após o procedimento. Antes da conjugação, grupos funcionais ativos podem ser introduzidos na proteína ou no PRP. Para determinar a consistência, a extensão da derivação é monitorada nessa etapa da produção. O conjugado é obtido pela ligação covalente de PRP e proteína. Os grupos funcionais residuais não reativos, mas potencialmente reatogênicos, podem estar presentes após o processo de conjugação. O processo deve ser validado para comprovar que grupos funcionais reativos não permanecem após a produção. O conjugado é então purificado para remoção de reagentes e submetido aos controles relacionados a seguir. Os limites aplicados para alguns desses controles estão listados na **Tabela 2**. Para uma vacina liofilizada, a qual é submetida ao processo de

liofilização que pode afetar o componente a ser analisado, alguns testes podem ser realizados no lote final.

Concentração de PRP. A concentração de PRP é determinada por *Método imunológico (5.6)*, *Cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (5.2.17.3)* ou *Ribose*. Quando o teor de polissacarídeo for determinado pela concentração de ribose, proceder conforme descrito em *Concentração de PRP, em Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*. O teor de polissacarídeo é calculado multiplicando-se o teor de ribose, expresso em micrograma por mililitro, pelo fator 2,488.

Proteína livre. A concentração pode ser determinada diretamente por um método adequado ou por derivação,

por meio do cálculo dos resultados de outros testes. O valor deve estar dentro dos limites aprovados para o produto.

Proteína. Proceder conforme descrito em *Proteína*, em *Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*. O resultado é calculado em microgramas por mililitro.

Razão Polissacarídeo/Proteína. Quociente entre concentração de polissacarídeo e concentração proteica. Para cada conjugado, a relação deve estar de acordo com a faixa aprovada no registro do produto aprovado pela autoridade regulatória nacional.

Reagentes residuais. A remoção de reagentes residuais tais como: cianeto, EDAC (etildimetilaminopropilcarbodiimida) e fenol, é confirmada por testes adequados ou por validação do processo.

Distribuição por tamanho molecular. Proceder conforme descrito em *Distribuição por tamanho*

molecular, em *Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*.

Para calcular a quantidade do conjugado eluído a um $K_d \leq 0,20$, o volume de eluição correspondente a um $K_d = 0,20$ é determinado segundo a expressão:

$$V_e = [0,2(V_t - V_o)] + V_o$$

Com o valor de V_e , a porcentagem de polissacarídeo eluído a $K_d \leq 0,20$ é então determinada, marcando esse valor no cromatograma e integrando a área do pico até esse ponto.

Para o conjugado, o valor aceitável deve estar de acordo com o registro do produto aprovado pela autoridade regulatória nacional.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste. Utilizar para cada meio de cultivo 10 mL ou o equivalente a 100 doses, o que for menor.

Tabela 2 – Requisitos para o conjugado a granel.

Teste	Proteína carreadora			
	Anatoxina diftérica	Anatoxina tetânica	Proteína diftérica CRM 197	Membrana proteica externa de Meningococo grupo B (OMP)
PRP livre	< 37%	< 20%	< 25%	< 15%
Proteína livre	< 4%	< 1%	< 1% ou < 2%, dependendo do método de conjugação	Não aplicável
Razão PRP/ Proteína	1,25 – 1,8	0,30 – 0,6	0,3 – 0,7	0,05 – 0,1
Peso molecular (Kd):		≥ 80% para $K_d \leq 0,20$		
agarose de ligação cruzada para cromatografia	95% < 0,75	60% < 0,2	50% 0,3 – 0,6	85% < 0,3
agarose de ligação cruzada para cromatografia	0,6 – 0,7	85% < 0,5		

No preparo da vacina, produto acabado a granel, pode ser adicionado um adjuvante, um conservante antimicrobiano e um estabilizador, antes da diluição final com diluente adequado. Antes do envase, amostras do produto são submetidas aos controles a seguir.

Timersal. Quando aplicável, proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

O produto é envasado em recipientes adequados e, se for o caso, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

O teste deve ser realizado por um *Método imunoquímico (5.6)* aprovado, utilizando anticorpos específicos para o polissacarídeo purificado.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra da vacina ou, no caso do componente liofilizado, o pH deve ser determinado após a reconstituição com o diluente adequado. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 3,0%.

Concentração de Polissacarídeo. A concentração de PRP é determinada por *Método imunológico (5.6)*, *Cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (5.2.17.3)* ou Ribose por espectrofotometria (Orcinol). Se for utilizado o teor de ribose, proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no visível (5.2.14)*. Para vacina liofilizada, dissolver o conteúdo de 20 frascos em cerca de 4 mL de água destilada e remover a lactose por diálise. Diluir o líquido dialisado residual a 10 mL com água destilada e determinar o teor de ribose da vacina conforme descrito em *Concentração de PRP*, em *Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*. O teor de PRP da vacina é calculado multiplicando-se o teor de ribose, expresso como micrograma por mililitro, por 2,488. No mínimo 80% da concentração declarada no rótulo.

Distribuição por tamanho molecular. É a porcentagem de PRP, eluído antes de um dado valor Kd ou dentro de uma faixa de valores Kd, determinada por *Cromatografia líquida de alta eficiência (5.2.17.4)* de exclusão por tamanho, conforme descrito em *Distribuição por tamanho molecular*, para o *Polissacarídeo Haemophilus influenzae (PRP)*. Para um lote de vacina, uma amostra de 5 doses da vacina é diluída em 2,5 mL de *Fase móvel*. Um valor aceitável é estabelecido, especificamente, para o produto e cada lote de vacina deve cumprir com esse limite. Os limites para produtos aprovados, utilizando as fases estacionárias indicadas, são listados, para informação, na **Tabela 2**.

Polissacarídeo livre. No máximo 20%. A concentração de PRP livre é determinada após a remoção do conjugado por formação de um complexo PRP-proteína carreadora-anticorpo ou por outros métodos validados. Verificar no sobrenadante, por *Método imunológico (5.6)*, o teor de polissacarídeo de Hib e a ausência de conjugado. Calcular a porcentagem de polissacarídeos livres na vacina segundo a expressão:

$$\% \text{ de PRP livre} = \frac{\text{teor de PRP do sobrenadante}}{\text{teor total de PRP da vacina}} \times 100$$

Timerosal. Quando aplicável, proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). Cumpre o teste. No máximo 25 UE/dose. Caso a vacina contenha algum componente que possa interferir no ensaio, deve ser realizado o teste de *Pirogênios (5.5.2.1)*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

**VACINA HEPATITE B
(RECOMBINANTE)**
**Vaccinum hepatitis B ADN
recombinatum**

A vacina contra hepatite B recombinante é uma suspensão de antígeno (HBsAg) purificado da superfície do vírus da hepatite B, adsorvido pelo hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, podendo conter conservante. Está, também, presente o gene S ou combinação dos genes S e pré-S2 ou dos genes S, pré-S2 e pré-S1. Tem o aspecto de suspensão opalescente que não apresenta grumos ou partículas estranhas.

A vacina é produzida pela expressão do gene viral codificado para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) em cepa recombinante de leveduras ou em cultura de células suscetíveis. O antígeno produzido cumpre os testes de esterilidade, retenção de plasmídeo e consistência antigênica. No caso de utilização de cultura de células de mamíferos, o antígeno produzido tem que demonstrar ausência de micoplasmas e vírus. Além disso, as células (célula hospedeira em combinação com o vetor de expressão do antígeno) utilizadas na produção são necessariamente procedentes de banco de células aprovado pela autoridade regulatória nacional.

O antígeno de superfície recombinante (HBsAg) é purificado por vários métodos físico-químicos e formulado em gel de hidróxido de alumínio ou fosfato

de alumínio. Os controles citados a seguir são pré-requisitos para a formulação da vacina.

ADN residual. No mínimo 100 pg/dose individual humana.

Proteínas. Determinadas por método apropriado.

Concentração antigênica. Avaliada por método imunológico validado.

Identificação. Avaliada por método imunológico validado.

Pureza. Determinada por comparação com vacina de referência utilizando método adequado como cromatografia líquida ou SDS-PAGE. Apresenta, no mínimo, 95% de proteínas do antígeno de superfície do vírus da hepatite B.

Íons inorgânicos. Os resíduos de íons inorgânicos, provenientes de sais utilizados no processo de produção, são determinados por métodos adequados.

Esterilidade. Cumpre o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

Soro animal. Se é utilizado soro de origem animal nos processos de produção, o resíduo de soro não é superior a 1 µL/L de vacina.

Outros componentes. Proteínas, lipídeos, ácido nucleico e carboidratos, também são determinados.

Antes do envase o produto é submetido a controles de adjuvante, conservante e esterilidade.

A vacina é envasada em recipientes adequados, rotulada e submetida aos controles requeridos.

Outras informações relativas à produção e seus controles estão indicadas na monografia de *Vacinas para uso humano*.

IDENTIFICAÇÃO

O *Doseamento* pode ser utilizado.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Alumínio. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 1,25 mg/dose individual humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Timersal. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

Pirogênios (5.5.2.1). Cumpre o teste.

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo 10 UE/mL.

DOSEAMENTO

Preparar, no mínimo, três diluições da vacina e de uma vacina de referência em solução isotônica de cloreto de sódio, contendo o adjuvante de alumínio utilizado na vacina. Cada diluição é inoculada por via intraperitoneal, em pelo menos, 10 camundongos BALB/c de haplotipo H-2^q ou H-2^d. Um grupo de animais é inoculado somente com o diluente. Os animais utilizados devem ter o mesmo sexo. Após quatro a seis semanas da inoculação, anestésiar e sangrar todos os animais. Separar individualmente os soros e determinar a presença de anticorpos para o vírus da hepatite B por método imunoenzimático. Registrar o número de animais que demonstram soroconversão em cada diluição e calcular a DE₅₀ (dose efetiva 50%), assim como a potência relativa por um método estatístico adequado. O ensaio é considerado válido se (a) a DE₅₀ encontrada estiver entre a menor e a maior concentração de vacina inoculada nos camundongos; (b) a análise estatística não demonstrar desvio de linearidade e paralelismo; (c) o limite de confiança da potência relativa estiver entre 30% e 300%.

O limite de confiança superior da potência relativa é, no mínimo, 1.

Métodos *in vitro* validados, tais como ensaio imunoenzimático e radio-imunoensaio, utilizando anticorpos monoclonais específicos para antígeno HBsAg, também podem ser utilizados.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA 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-acetilmanosamina 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 através de procedimentos efetivos na remoção de ácidos nucleicos, proteínas e lipopolissacarídeos.

A etapa final de purificação consiste de precipitação dos polissacarídeos por etanol, 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 imunológico* (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 100 mL de hidróxido de sódio 0,1 M.

Solução B: dissolver 1 g de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄·5H₂O) em 100 mL de água destilada.

Solução C: dissolver 2 g de tartarato de sódio/potássio em 100 mL de água destilada. 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* e completar para 50 mL com a *Solução A*.

Pipetar para tubos de ensaio os volumes de *Solução padrão estoque de BSA 0,02% (albumina sérica bovina)* e água destilada, descritos na **Tabela 1**, para construção da curva analítica:

Tabela 1 – Valores de concentração e volume de solução padrão estoque de BSA e volume de água destilada usados no teste

<i>Concentração de BSA</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Volume de BSA estoque</i> (μL)	<i>Volume de água destilada</i> (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 ($\mu\text{g/mL}$) versus leituras de absorvância, com os resultados obtidos nas diversas diluições e calcular, através da mesma, 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 ($\mu\text{g/mL}$);

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. Em um tubo de ensaio, adicionar uma gota dessa solução e, em outro tubo, fazer um controle positivo adicionando uma gota da *Solução padrão de fenol*. Adicionar aos 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*. A reação 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. Adicionar água destilada até completar o volume para 1000 mL. O pH deverá ser de 9,8. Conservar em geladeira ao abrigo da luz.

Solução de 4-aminoantipirina: pesar 3 g de 4-aminoantipirina e adicionar água destilada até completar o volume para 1000 mL. A solução deverá ser preparada no momento do uso.

Solução de ferricianeto de potássio: pesar 12 g de ferricianeto de potássio e adicionar água destilada até completar o volume para 1000 mL. Conservar em geladeira ao abrigo da luz.

Solução de fosfato de potássio monobásico M: pesar 136 g de fosfato de potássio monobásico e adicionar água destilada até completar o volume para 1000 mL.

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

$\% \text{ÁcNu}$ = % 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 em microtubos 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:

$$V_e = K_d \times (V_t - V_0) + V_0$$

em que

V_e = volume de eluição;

K_d = 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 K_d igual 0,5. No mínimo 65% do polissacarídeo do grupo A, 75% do polissacarídeo do grupo C e 80% dos polissacarídeos grupos Y e W_{135} , respectivamente, deve ser eluída antes de se atingir um K_d 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 acetoneitrila, de forma que a mesma 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 monohidratado e completar o volume para 800 mL.

Marcadores: V_0 = padrão de Pullulan $1,6 \times 10^6$ e V_1 = sacarose. Pesar 5 mg de marcador, em microtubos 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 abaixo adicionando os seguintes volumes nos respectivos tubos.

Tabela 2 – Preparações das soluções branco, padrões e amostras.

Substâncias	Água destilada (µL)	Solução padrão de trabalho de acetilcolina 600 µg/mL (µL)	Polissacarídeo A: amostra 1:20 (µL)	Polissacarídeo C: amostra 1:10 (µL)
Branco	1000	---	---	---
Amostras	---	---	1000	---
	---	---	---	1000
P1 (30 ppm)	950	50	---	---
P2 (120 ppm)	800	200	---	---
P3 (240 ppm)	600	400	---	---
P4 (480 ppm)	200	800	---	---
P5 (600 ppm)	---	1000	---	---

Solução alcalina de hidroxilamina: misturar em volumes iguais as *Soluções A e B* no momento do uso.

Solução A: pesar 13,9 g de cloridrato de hidroxilamina e adicionar água destilada para 100 mL. Conservar a solução a 4 °C.

Solução B: pesar 140 g de hidróxido de sódio e adicionar água destilada para 1000 mL.

Solução C: pesar 1,5 g de cloreto de acetilcolina e adicionar água destilada para 100 mL.

Ácido clorídrico 1:3: adicionar em um frasco graduado 200 mL de ácido clorídrico concentrado e completar com água destilada para 600 mL.

Solução de cloreto férrico 0,37 M: pesar 50 g de cloreto férrico hexa-hidratado e adicionar ácido clorídrico 0,1 M para 500 mL.

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 2 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:

em que

$O\text{-acetil} = \text{concentração de grupos } O\text{-acetil (µmoles/mg)}$;

$L_a = \text{leitura da amostra (µmol/mL)}$;

$m = \text{massa do polissacarídeo seco (mg)}$.

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 4 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 a seguir.

Tabela 3 – Preparações das soluções padrões de fósforo para construção da curva analítica.

Concentração de fósforo ($\mu\text{g}/\text{tubo}$)	Volume da solução padrão de fósforo 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (mL)	Volume de água destilada (mL)
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 2 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: em balão volumétrico de 10 mL, adicionar 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e completar o volume com ácido perclórico a 70% (p/p). Armazenar a solução a 4 °C.

Reativo de coloração: no momento de utilização da 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$: essa solução deve ser preparada por diluição a (1:20) da *Solução padrão de fósforo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$* .

Solução padrão de fósforo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 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). Adicionar em 8 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 balão volumétrico contendo 2/3 de água destilada e completar o volume até 50 mL com água destilada. Esta solução límpida 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: em balão volumétrico de 100 mL, adicionar 15 mL de 1-butanol e completar o volume com acetato de butila.

Solução estoque de ácido N-acetil neuramínico (NANA): em balão volumétrico de 100 mL adicionar 40 mg de ácido N-acetil neuramínico e completar o volume com água destilada. Distribuir 2 mL desta solução em frascos de pequeno volume e congelar a -20 °C.

Solução de trabalho a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$: em balão volumétrico de 10 mL adicionar 2 mL da *Solução estoque de ácido N-acetil neuramínico (NANA)* e completar o volume com água destilada.

Reativo de coloração: no momento do uso, adicionar em 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 a 50 mL com água destilada.

Calcular a porcentagem de ácido siálico segundo a expressão:

$$\% \text{ÁcSi} = \frac{T_c \times 291,80 \times 100}{m \times 0,5 \times 309,28}$$

em que

%ÁcSi = porcentagem de ácido siálico;

T_c = 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 balão volumétrico e completar o volume até 500 mL com água destilada.

Solução de hidróxido 10%: pipetar 20 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 50% (p/v) para balão volumétrico e completar o volume até 100 mL com água destilada.

Calcular a concentração de cálcio pela equação.

$$\% \text{Cálcio} = \frac{V \times N \times f \times 0,04 \times 100}{\text{massa do polissacarídeo seco (g)}/10}$$

em que

V = volume gasto de EDTA (mL);

N = normalidade do EDTA;

f = fator de correção do EDTA;

0,04 = mEq do cálcio.

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 límpida e incolor.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 3%.

Distribuição por tamanho molecular. Proceder conforme descrito em *Distribuição por tamanho molecular* para os polissacarídeos purificados, por exclusão de tamanho.

Para uma vacina grupos A e C, 65% e 75%, respectivamente, dos grupos A e C são eluídos antes do K_d (coeficiente de distribuição) igual a 0,50.

Para uma vacina tetravalente (grupos A, C, Y e W₁₃₅), quando se aplica a cromatografia e um método imunoquímico, os K_d para um pico principal devem ser menores ou iguais a 0,70 para os grupos A e C, 0,57 para o grupo Y e 0,68 para o grupo W₁₃₅.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

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 μ A, 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 5 minutos.

Solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M: pesar em um frasco de 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 e adicionar água ultrapurificada até completar o volume. Homogeneizar a solução.

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 a 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 μ m de tamanho de poro, antes de ser utilizada.

Solução de hidróxido de sódio M: pesar em um frasco de 100 mL, 4 g de hidróxido de sódio e dissolver em aproximadamente 70 mL de água ultrapurificada. Transferir a solução em balão volumétrico de 100 mL e adicionar água ultrapurificada até completar o volume. Homogeneizar a solução. A solução deve ser filtrada com filtro de 0,22 μ m 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 com filtro de 0,22 μ m 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 μ g/mL. Reconstituir a vacina meningocócica com *Tampão de fosfato-borato* e filtrá-la com filtro de 0,22 μ m 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 μ L, 600 μ L, 750 μ L, 900 μ L e 1050 μ L da solução contendo 500 μ g/mL de polissacarídeo de cada sorogrupo e, também respectivamente, 1050 μ L, 900 μ L, 750 μ L, 600 μ L e 450 μ L de *Tampão de fosfato-borato*. (Observação: filtrar com filtro de 0,22 μ m 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: $y = ax + b$.

$$\text{Concentração de polissacarídeo } (\mu\text{g/mL}) = \frac{(y - b)}{a}$$

Concentração de polissacarídeo (μ g/dose) =

$$\left(\left(\frac{y - b}{a} \right) \times 2,5 \right) \div 10$$

em que

y = área relativa a cada polissacarídeo;

a = coeficiente angular;

c = coeficiente linear;

2,5 = volume de tampão usado para reconstituição do liofilo;

10 = número de doses da vacina.

Os seguintes métodos também podem ser utilizados:

Para uma vacina dos grupos A e C, verificar a concentração de fósforo e ácido siálico como já descritos.

Para uma vacina tetravalente, utilizar um método imunoquímico adequado com um padrão de referência para cada um dos grupos A, C, Y e W₁₃₅.

Cada polissacarídeo deve estar contido na vacina na faixa de 70 a 130% do valor estabelecido no rótulo.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpra o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VACINA MENINGOCÓCICA C (CONJUGADA)

Vaccinum meningococcale classis C conjugatum

A vacina meningocócica grupo C (conjugada) é uma preparação líquida ou liofilizada de polissacarídeo capsular, obtido a partir de uma cepa adequada de *Neisseria meningitidis* grupo C, covalentemente ligado a uma proteína carreadora.

O polissacarídeo meningocócico grupo C consiste de unidades repetidas de ácidos siálicos, parcialmente *O*-acetilado ou *O*-desacetilado, ligadas com pontes glicosídicas 2 α →9. A proteína carreadora, quando conjugada ao polissacarídeo meningocócico grupo C, é capaz de induzir uma resposta imune dependente de célula-T. A vacina pode conter um adjuvante.

A produção do polissacarídeo meningocócico grupo C é baseada no sistema de lote semente, que é uma quantidade de ampolas contendo *N. meningitidis* grupo C liofilizado, de composição uniforme, obtido a partir de uma cepa liofilizada de procedência conhecida. Os meios de cultura utilizados para preservar a viabilidade da cepa liofilizada não devem ser constituídos de proteínas de origem animal. A pureza da cultura deve ser avaliada pela morfologia das colônias, exame microscópico, inoculação da amostra em meios de cultivo adequados e aglutinação da cultura com anti-soro específico.

A *N. meningitidis* grupo C é cultivada em um meio líquido adequado, que não contém polissacarídeos de alto peso. A cultura pode ser inativada por calor e filtrada antes da precipitação do polissacarídeo. O precipitado é purificado por métodos adequados para a remoção de ácidos nucleicos, proteínas e lipopolissacarídeos; a etapa final de purificação deve consistir de uma precipitação com etanol, podendo também ser incluída uma etapa de *O*-desacetilação. As substâncias voláteis no polissacarídeo purificado, inclusive água, são determinadas por termogravimetria ou outro método adequado. O valor é utilizado para o cálculo dos resultados de outros testes com referência à substância dessecada.

Somente os polissacarídeos meningocócicos grupo C que cumprirem os requisitos a seguir podem ser utilizados na formulação da vacina produto à granel.

Identificação. O polissacarídeo meningocócico grupo C é identificado por um *Método imunoquímico (5.6)* ou outro método adequado, como espectrometria por ressonância magnética nuclear 1H.

Proteína. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacina meningocócica ACWY (polissacarídica)*. No máximo 1,0% de proteína na substância seca.

Ácido nucleico. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacina meningocócica ACWY (polissacarídica)*. No máximo 1,0% por grama de polissacarídeo, calculado com referência à substância seca.

Distribuição por tamanho molecular. A porcentagem de polissacarídeo eluído antes de um dado valor Kd (coeficiente de distribuição) ou dentro de uma faixa de valores Kd, é determinada por *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)* de exclusão por tamanho. Um valor aceitável é estabelecido especificamente para o produto e cada lote do polissacarídeo meningocócico grupo C deve estar de acordo com este limite.

Grupos *O*-acetil. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacina meningocócica ACWY (polissacarídica)*. Um valor aceitável é estabelecido para cada produto e cada lote do polissacarídeo meningocócico grupo C deve estar de acordo com este limite.

Ácido siálico. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacina meningocócica ACWY (polissacarídica)*. No mínimo 0,800 g de ácido siálico por grama de polissacarídeo meningocócico grupo C.

Reagentes residuais. Quando for relevante, devem ser realizados testes para determinar resíduos de reagentes utilizados durante a inativação e a purificação. Um valor aceitável para cada reagente é estabelecido especificamente para o produto e cada lote de polissacarídeo meningocócico grupo C deve estar de acordo com este limite. Caso os métodos para remoção de um reagente residual tenham sido validados, o teste no polissacarídeo meningocócico grupo C pode ser omitido.

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). No máximo 100 UE/ μ g de polissacarídeo meningocócico grupo C.

PROTEÍNA CARREADORA

A proteína carreadora, quando conjugada ao polissacarídeo meningocócico grupo C, deve ser capaz de induzir uma atividade imunogênica adequada. A anatoxina tetânica ou a proteína diftérica CRM 197 são aprovadas para a conjugação. As proteínas carreadoras são produzidas através da cultura dos respectivos microrganismos, na qual é verificada a pureza bacteriana. O cultivo pode ser inativado e a proteína carreadora é purificada por métodos adequados. A proteína carreadora a ser utilizada no preparo do conjugado deve cumprir com os seguintes requisitos. Os microrganismos utilizados para a produção da proteína carreadora devem ser cultivados em meios de cultura livres de substâncias que possam causar reações tóxicas ou alergênicas ao ser

humano. Caso algum componente de origem animal for utilizado no preparo ou preservação do lote semente, ou no processo produtivo, deve cumprir com as exigências estipuladas pela autoridade regulatória nacional.

Identificação. A proteína carreadora é identificada sorologicamente por um *Método imunoquímico (5.6)* adequado. Os métodos físico-químicos que podem ser utilizados para caracterizar a proteína incluem SDS-PAGE, focalização isoeletrica, CLAE, análise de aminoácidos, sequência de aminoácidos, dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência, mapeamento de peptídeo e espectrometria de massa.

Anatoxina tetânica. A anatoxina tetânica é produzida como descrito na monografia de *Toxoide tetânico adsorvido*. Cumpre com os requisitos para anatoxina tetânica purificada, exceto para o teste de esterilidade, o qual não é requerido. O produto apresenta pureza antigênica de, no mínimo, 1500 Lf/mg de nitrogênio proteico.

Proteína diftérica CRM 197. Contém, no mínimo, 90% de proteína diftérica CRM 197, determinada por um método adequado. Alguns testes devem ser realizados, para validação ou rotineiramente, para demonstrar ausência de toxicidade no produto.

O polissacarídeo meningocócico grupo C é modificado quimicamente, sendo parcialmente despolimerizado antes ou durante o procedimento. O conjugado é obtido pela ligação covalente do oligossacarídeo meningocócico grupo C ativado e a proteína carreadora e deve ser submetido aos seguintes controles.

Concentração de sacarídeo. O teor de sacarídeo é determinado por um teste validado adequado, como o ensaio *Ácido siálico*, conforme descrito na monografia de *Vacina meningocócica ACWY (polissacarídica)*, e *Cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (5.2.17.3)*.

Proteína. O conteúdo de proteína deve ser determinado por um método validado e aprovado pela autoridade regulatória nacional. Um valor aceitável é estabelecido para cada produto e cada lote de conjugado a granel deve estar de acordo com este limite.

Razão polissacarídeo/proteína. Quociente entre concentração de polissacarídeo e concentração proteica. Para cada conjugado, a relação deve estar de acordo com a faixa aprovada pela autoridade regulatória nacional.

Distribuição por peso molecular. A porcentagem de polissacarídeo eluído antes de um dado valor Kd ou dentro de uma faixa de valores Kd, é determinada por *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)* de exclusão por tamanho. Um valor aceitável é estabelecido especificamente para o produto e cada lote de conjugado a granel de polissacarídeo deve estar de acordo com este limite.

Polissacarídeo livre. A concentração de polissacarídeo livre é determinada após a remoção do conjugado, por

cromatografias de troca iônica, exclusão por tamanho ou hidrofóbica, ultrafiltração, *Ensaio imunoquímico (5.6)* ou outros métodos validados. Um valor aceitável é estabelecido para cada produto e cada lote de conjugado a granel deve estar de acordo com este limite.

Proteína livre. A concentração pode ser determinada diretamente por um método adequado ou por derivação, através do cálculo dos resultados de outros testes. O valor deve estar dentro dos limites aprovados para cada produto.

Reagentes residuais. A remoção de reagentes residuais, como cianeto, é confirmada por testes adequados ou por validação do processo.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste. Utilizar para cada meio de cultivo 10 mL ou o equivalente a 100 doses, o que for menor.

No preparo da vacina produto acabado a granel podem ser adicionados um adjuvante, um conservante e um estabilizador, antes da diluição final com diluente adequado. Antes do envase, as amostras do produto devem ser submetidas aos testes de *Esterilidade* e *Timerosal*.

O produto é envasado em recipientes adequados e, se for o caso, liofilizado, rotulado e submetido aos controles requeridos.

IDENTIFICAÇÃO

O teste de identidade deve ser realizado por um *Método imunoquímico (5.6)* aprovado, utilizando anticorpos específicos para o polissacarídeo purificado.

CARACTERÍSTICAS

pH (5.2.19). Determinar o pH na amostra da vacina ou, no caso do componente liofilizado, o pH deve ser determinado após a reconstituição com o diluente adequado. Os limites devem ser determinados pelo histórico no registro do produto.

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Umidade residual. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 3%.

Timerosal. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 200 ppm. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Alumínio. Proceder conforme descrito na monografia de *Vacinas para uso humano*. No máximo 1,25 mg/dose

individual humana. É facultada ao produtor a utilização do resultado obtido no produto antes do envase.

Polissacarídeo livre. A concentração de polissacarídeo livre é determinada após a remoção do conjugado por cromatografias de troca iônica, exclusão por tamanho ou hidrofóbica, ultrafiltração, *Método imunológico (5.6)* ou outros métodos validados. Um valor aceitável consistente com imunogenicidade adequada, conforme descrito em estudos clínicos, é estabelecido para cada produto e cada lote final deve estar de acordo com este limite.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2). Cumpre o teste. No máximo 25 UE por dose humana.

DOSEAMENTO

Concentração de sacarídeo. Determinar a concentração de polissacarídeo através do ensaio *Ácido siálico*, conforme descrito na monografia de *Vacina meningocócica ACWY (polissacarídica)*, ou por *Cromatografia líquida de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (5.2.17.3)*. No mínimo 80% da concentração de polissacarídeo do grupo C declarada no rótulo.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumpre o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

VARFARINA SÓDICA COMPRIMIDOS

Contém, no mínimo, 92,5% e, no máximo, 107,5%, da quantidade declarada de $C_{19}H_{15}NaO_4$.

IDENTIFICAÇÃO

A. Pesar e pulverizar os comprimidos. Utilizar quantidade do pó equivalente a 200 mg de varfarina sódica, adicionar 50 mL de água, centrifugar e filtrar o sobrenadante. Extrair com 50 mL de éter etílico e transferir a fase aquosa para um segundo funil de separação, descartando a fase orgânica. Ajustar o pH da fase aquosa para 2,5 com ácido clorídrico. Extrair com 50 mL de clorofórmio e transferir a fase orgânica para um

terceiro funil de separação. Extrair com 50 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 0,004 (p/v), descartando a fase orgânica. Ajustar o pH da fase aquosa para 2,5 com ácido clorídrico. Filtrar e lavar o precipitado com quatro porções de 5 mL de água. Caso o precipitado não esteja branco ou quase branco dissolver em um volume mínimo de uma solução de hidróxido de sódio a 0,004 (p/v), diluir até 50 mL com água e repetir o processo de extração. Secar em dessecador a vácuo durante 4 horas. O precipitado responde ao teste **A.** de *Identificação* da monografia de *Varfarina sódica*.

B. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtida em *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Solução padrão*.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de peso (5.1.1). Cumpre o teste.

Teste de dureza (5.1.3.1). Cumpre o teste.

Teste de friabilidade (5.1.3.2). Cumpre o teste.

Teste de desintegração (5.1.4.1). Cumpre o teste.

Uniformidade de doses unitárias (5.1.6). Cumpre o teste.

TESTE DE DISSOLUÇÃO (5.1.5)

Meio de dissolução: água, 900 mL

Aparelhagem: pás, 50 rpm

Tempo: 30 minutos

Procedimento: após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução e filtrar. Prosseguir conforme descrito em *Doseamento*. Calcular a quantidade de $C_{19}H_{15}NaO_4$ dissolvida no meio, comparando as respostas obtidas com a solução de varfarina SQR na concentração de 0,0005% (p/v), preparada em *Fase móvel*.

Tolerância: não menos que 80% (Q) da quantidade declarada de $C_{19}H_{15}NaO_4$ se dissolvem em 30 minutos.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Contagem do número total de micro-organismos mesofilos (5.5.3.1.2). Cumpre o teste.

Pesquisa de micro-organismos patogênicos (5.5.3.1.3). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito no método **B.** de *Doseamento* da monografia de *Varfarina sódica*. Preparar a *Solução amostra* como descrito a seguir.

Solução amostra: pesar e pulverizar 20 comprimidos. Transferir quantidade do pó equivalente a 25 mg de varfarina sódica para balão volumétrico de 25 mL, adicionar 15 mL de *Diluyente* e deixar em ultrassom durante 20 minutos. Completar o volume com *Diluyente*, homogeneizar e filtrar. Diluir, sucessivamente, em *Fase móvel*, para obter solução a 100 µg/mL.

Procedimento: injetar, separadamente, 20 µL da *Solução amostra* e da *Solução padrão*, registrar os cromatogramas e medir a área média sob os picos. Calcular o teor de $C_{19}H_{15}NaO_4$ na amostra a partir das respostas obtidas para a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados e protegidos da luz.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.



ANVISA
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ministério da
Saúde

