

# FARMACOPEIA BRASILEIRA

6ª EDIÇÃO



Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Farmacopeia  
Brasileira,  
6ª edição

Volume II – Monografias

Produtos Biológicos

Brasília  
2019

**PRODUTOS BIOLÓGICOS**

DALTEPARINA SÓDICA	PB001-00
ENOXAPARINA SÓDICA	PB002-00
HEPARINA CÁLCICA	PB003-00
HEPARINA CÁLCICA SOLUÇÃO INJETÁVEL	PB004-00
HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR	PB005-00
HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR SOLUÇÃO INJETÁVEL	PB006-00
HEPARINA SÓDICA BOVINA	PB007-00
HEPARINA SÓDICA SUÍNA	PB008-00
HEPARINA SÓDICA SOLUÇÃO INJETÁVEL	PB009-00
INSULINA	PB010-00
INSULINA HUMANA	PB011-00
INSULINA HUMANA INJETÁVEL	PB012-00
INSULINA HUMANA ISOFANA SUSPENSÃO	PB013-00
INSULINA HUMANA ISOFANA SUSPENSÃO E INSULINA HUMANA INJETÁVEL	PB014-00
INSULINA HUMANA ZINCO SUSPENSÃO	PB015-00
INSULINA HUMANA ZINCO SUSPENSÃO ESTENDIDA	PB016-00
INSULINA INJETÁVEL	PB017-00
INSULINA LISPRO	PB018-00
NADROPARINA CÁLCICA	PB019-00
SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE)	PB020-00
SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE) E ANTILAQUÉTICO	PB021-00
SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE) E ANTICROTÁLICO	PB022-00
SORO ANTIBOTRÓPICO (PENTAVALENTE), ANTICROTÁLICO E ANTILAQUÉTICO	PB023-00
SORO ANTIBOTULÍNICO (TRIVALENTE)	PB024-00
SORO ANTICROTÁLICO	PB025-00
SORO ANTIDIFTÉRICO	PB026-00
SORO ANTIELAPÍDICO (BIVALENTE)	PB027-00
SORO ANTIESCORPIÔNICO	PB028-00
SORO ANTILONÔMICO	PB029-00
SORO ANTILOXOSCÉLICO (TRIVALENTE)	PB030-00
SORO ANTIRRÁBICO	PB031-00
SORO ANTITETÂNICO	PB032-00
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-A PARA USO HUMANO	PB033-00
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-A,B PARA USO HUMANO	PB034-00
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-B PARA USO HUMANO	PB035-00
SORO REAGENTE DE TIPAGEM SANGUÍNEA ANTI-RH (ANTI-D, ANTI-C, ANTI-E, ANTI-C, ANTI-E E ANTI-CW) PARA USO HUMANO	PB036-00
SOROS HIPERIMUNES PARA USO HUMANO	PB037-00
TINZAPARINA SÓDICA	PB038-00
TOXOIDE TETÂNICO ADSORVIDO	PB039-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA E TÉTANO ADULTO	PB040-00

---

VACINA ADSORVIDA DIFTERIA E TÉTANO INFANTIL	PB041-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO E PERTUSSIS	PB042-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS E HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)	PB043-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS, HEPATITE B (RECOMBINANTE) E HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)	PB044-00
VACINA ADSORVIDA DIFTERIA, TÉTANO, PERTUSSIS, POLIOMIELITE 1, 2 E 3 (INATIVADA) E HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)	PB045-00
VACINA BCG	PB046-00
VACINA CAXUMBA (ATENUADA)	PB047-00
VACINA FEBRE AMARELA (ATENUADA)	PB048-00
VACINA HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)	PB049-00
VACINA HEPATITE B (RECOMBINANTE)	PB050-00
VACINA INFLUENZA (ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE, INATIVADA)	PB051-00
VACINA INFLUENZA (FRAGMENTADA, INATIVADA)	PB052-00
VACINA MENINGOCÓCICA ACWY (POLISSACARÍDICA)	PB053-00
VACINA MENINGOCÓCICA C (CONJUGADA)	PB054-00
VACINA POLIOMIELITE 1, 2 E 3 (ATENUADA)	PB055-00
VACINA POLIOMIELITE 1, 2 E 3 (INATIVADA)	PB056-00
VACINA RAIVA (INATIVADA)	PB057-00
VACINA ROTAVÍRUS HUMANO (ATENUADA)	PB058-00
VACINA RUBÉOLA (ATENUADA)	PB059-00
VACINA SARAMPO (ATENUADA)	PB060-00
VACINA SARAMPO, CAXUMBA, RUBÉOLA	PB061-00
VACINA SARAMPO, CAXUMBA, RUBÉOLA E VARICELA (ATENUADA)	PB062-00
VACINA SARAMPO, RUBÉOLA	PB063-00
VACINA VARICELA (ATENUADA)	PB064-00
VACINAS PARA USO HUMANO	PB065-00

## HEPARINA CÁLCICA

### Heparinum calcicum

A heparina cálcica é uma preparação contendo o sal cálcico de uma mistura de glicosaminoglicanos sulfatados, de peso variável, presente em tecidos de mamíferos. Normalmente é obtida a partir do pulmão bovino ou a partir da mucosa intestinal suína. É composta de polímeros com unidades de *D*-glicosamina (*N*-sulfatada ou *N*-acetilada) e ácido urônico (ácido *L*-idurônico ou *D*-glicurônico) que se alternam unidos por ligações glicosídicas. Possui a propriedade de prolongar o tempo de coagulação sanguínea principalmente pela formação de complexo de alguns dos componentes da mistura com proteínas específicas do plasma potencializando a inativação da trombina (fator IIa). Outras proteases envolvidas no processo de coagulação, como o fator X ativado (fator Xa), também são inibidas. A razão da atividade antifator Xa pela potência do antifator IIa deve estar entre 0,9 e 1,1. A potência da heparina cálcica não deve ser inferior a 180 UI/mg, em relação à substância dessecada. Os animais dos quais a heparina é derivada devem preencher os requisitos sanitários para a espécie em questão e o processo de produção deve garantir a remoção ou inativação de agentes infecciosos.

#### IDENTIFICAÇÃO

**A.** Cumpre com as exigências do *Doseamento*, conforme o método de *Determinação da potência* ou o método de *Potência antifator IIa*.

**B.** Utilizar a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Preparar as soluções conforme descrito a seguir:

*Solução amostra:* não menos que 20 mg/mL da amostra em óxido de deutério 99,9% com 0,02% (p/v) de trimetilsililpropiónico de sódio.

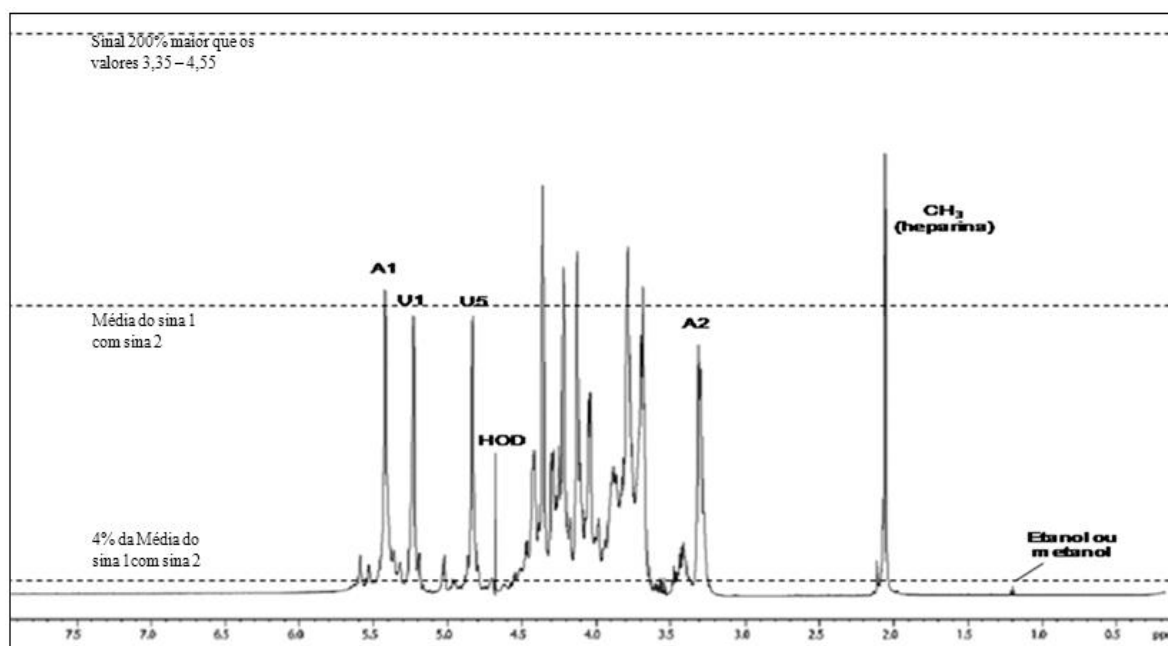
*Solução padrão:* não menos que 20 mg/mL de heparina cálcica SQR em óxido de deutério 99,9% com 0,02% (p/v) de trimetilsililpropiónico de sódio.

*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 <sup>1</sup>H sob decaimento livre utilizando 16 scans em pulso de 90°. O ensaio deve ser realizado sob a temperatura constante de 25 °C. A janela espectral deve ser no mínimo de 10 a -2 ppm. Para todas as amostras o metil do composto trimetilsililpropiónico deve ser referenciado em 0,00 ppm. Os deslocamentos químicos de quatro regiões típicas da heparina suína são; H1 da glucosamina *N*-acetilada/glucosamina *N*-sulfatada (sinal 1) em 5,40 ppm, H1 do ácido idurônico 2-sulfatado (sinal 2) em 5,21 ppm, H2 da glucosamina *N*-sulfatada em 3,28 ppm e metil da glucosamina *N*-acetilada em 2,05 ppm. Os valores de ppm observados para cada sinal não devem variar ± 0,03 ppm.

Os critérios de aceitação são baseados no valor médio da altura dos sinais 1 e 2. Qualquer sinal identificado, nos seguintes campos: 0,10 - 2,00, 2,10 - 3,20 e 5,70 - 8,00 ppm, não devem ultrapassar 4% da média do valor da altura dos dois sinais citados acima. Da mesma forma não devem ser encontrados sinais 200% maiores que este valor entre 3,35 - 4,55 ppm.

*Impurezas:* sulfato de condroitina sobre-sulfatado. O deslocamento químico da região *N*-acetil do sulfato de condroitina sobre-sulfatado deve ser observado entre 2,13 e 2,19 ppm.

*Sulfato de dermatam*: O deslocamento químico da região *N*-acetil do sulfato de condroitina sobre-sulfatado deve ser observado entre 2,07 e 2,13 ppm.



C. Utilizar a técnica de cromatografia líquida de troca iônica. A cromatografia de troca iônica é um ensaio para determinação de pureza das preparações de heparina, principalmente para detecção e separação de sulfato de dermatam, sulfato de condroitina e sulfato de condroitina sobre-sulfatado. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 202 nm; pré-coluna de 50 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, empacotada com resina trocadora de ânions (13 mm); coluna de 250 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, empacotada com resina trocadora de ânions (9 mm), mantida a 40 °C; fluxo da *Fase móvel* de 0,22 mL/minuto.

*Padrões de referências*: *Solução para ensaio (a)* e *Solução de referência (a)*, retenção relativa da heparina referência (tempo de retenção = cerca de 26 min); dermatam e sulfato de condroitina = cerca de 0,9; sulfato de condroitina sobresulfatado = 1,3, em relação a heparina.

**Nota**: as soluções de referência devem ser estabilizadas por 24 horas a temperatura ambiente.

*Sistema de adequação*: *Solução de referência*; relação de pico e vale: mínimo de 1,3, onde  $H_p$  = altura acima da linha de base do pico devido ao dermatam e o sulfato de condroitina;  $H_v$  = altura acima da linha de base o ponto mais baixo da curva que separa este cume do pico devido à heparina.

O pico principal no cromatograma obtido com a *Solução de ensaio (a)* deve ser semelhante em forma e tempo de retenção do pico principal no cromatograma obtido com a *Solução de referência (a)*.

Preparar as soluções para o teste como descrito a seguir.

*Solução para ensaio (a)*: dissolver cerca de 50 mg da substância para ser examinada pesada com precisão em 5 mL de água para cromatografia (água deionizada com uma resistividade não menos que 0,18 Mohms). Misturar com um vórtice até completa dissolução.

*Solução para ensaio (b)*: dissolver cerca de 0,1 g da substância para ser examinada, pesada com precisão em 1 mL de água para cromatografia. Misturar com um vórtice até completa dissolução.

Misturar 0,5 mL da solução e 0,25 mL de ácido clorídrico *M*, em seguida, adicionar 50 µL de solução de nitrito de sódio a 250 mg/mL. Misture delicadamente e deixe repousar à temperatura ambiente por 40 min antes de adicionar 0,2 mL de hidróxido de sódio *M* para parar a reação.

*Solução de referência (a)*: dissolver 250 mg de heparina SQR em água por cromatografia e diluir para 2 mL com o mesmo solvente. Misturar usando um vórtice até completa dissolução.

*Solução de referência (b)*: adicionar 1,2 mL de *Solução de referência (a)* e 0,3 mL de sulfato de dermatam e sulfato de condroitina sobre-sulfatado. Misturar com um vórtice para homogeneizar.

*Solução de referência (c)*: adicionam-se 0,1 mL de *Solução de referência (b)* e 0,9 mL de água para cromatografia. Misturar com um vórtice para homogeneizar.

*Solução de referência (d)*: adicionar 0,4 mL de *Solução de referência (a)* para 0,1 mL de água para cromatografia e misture com um vórtice. Adicionar 0,25 mL de ácido clorídrico *M*, em seguida, adicionar 50 µL de solução de nitrito de sódio a 250 mg/mL. Misture delicadamente e deixe repousar à temperatura ambiente por 40 minutos antes de adicionar 0,2 mL de hidróxido de sódio *M* para parar a reação.

*Solução de referência (e)*: a 0,5 mL de *Solução de referência (b)*, adicionar 250 µL de ácido clorídrico *M*, em seguida, adicionar 50 µL de solução de nitrito de sódio a 250 mg/mL. Misturar suavemente e deixar repousar em temperatura ambiente por 40 minutos antes de adicionar 0,2 mL de hidróxido de sódio *M* para parar a reação.

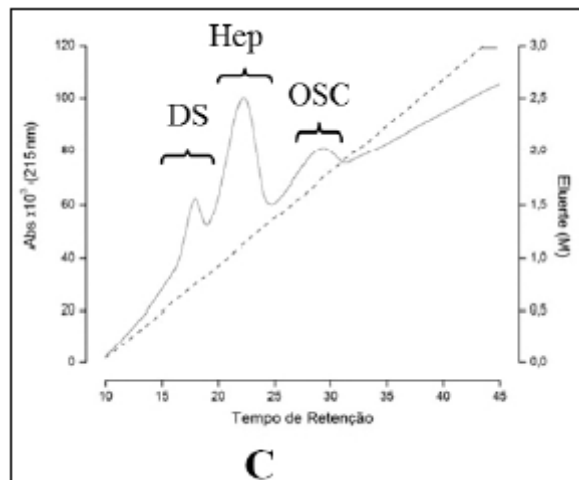
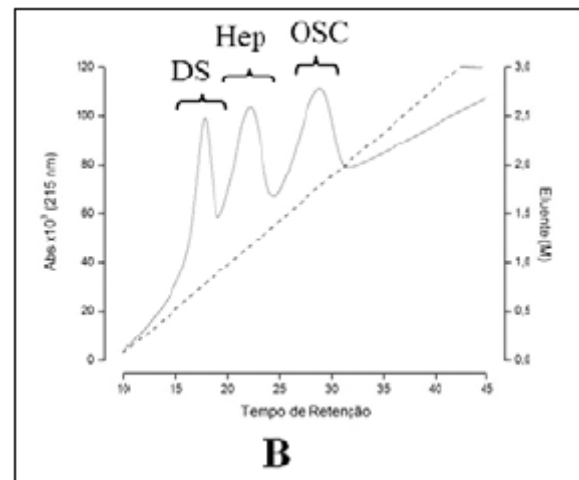
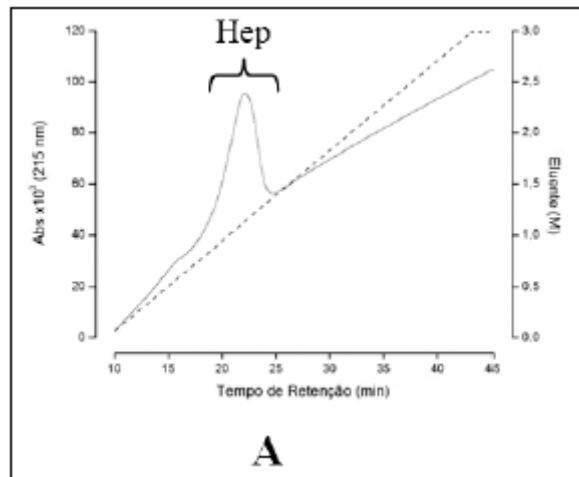
*Fase móvel A*: dissolver 0,4 g de fosfato de sódio monobásico em 1000 mL de água para cromatografia e ajustar o pH para 3,0 com solução diluída de ácido fosfórico;

*Fase móvel B*: dissolver 0,4 g de fosfato de sódio monobásico em 1000 mL de água para cromatografia, adicione 140 g de perclorato de sódio e ajustar ao pH 3,0 com ácido fosfórico diluído, filtrar e desgaseificar.

*Gradiente da Fase móvel*: adotar o sistema de gradiente descrito na tabela a seguir:

<i>Tempo (minutos)</i>	<i>Fase móvel A% (v/v)</i>	<i>Fase móvel B% (v/v)</i>	<i>Eluição</i>
0 - 10	75	25	isocrática
10 - 35	75 → 0	25 → 100	gradiente linear
35 - 40	0	100	isocrática

*Procedimento*: injetar 20 µL de *Solução de teste (b)* e *Soluções de referência (d)* e *(e)*. A retenção relativa com referência à heparina (tempo de retenção = cerca de 26 minutos): sulfato de dermatam e sulfato de condroitina = cerca de 0,9; sulfato de condroitina sobre-sulfatado = 1,3. Equilíbrio: pelo menos 15 min. A resolução é de no mínimo 3,0 entre os picos relativo ao sulfato de dermatam mais sulfato de condroitina e sulfato de condroitina sobresulfatado no cromatograma obtido com referência. Soma das áreas de sulfato de dermatam e sulfato de condroitina não é maior do que a área sob o pico correspondente no cromatograma obtido com a *Solução de referência (e)* 2,0%. Não podem existir outros picos além do pico relativo à sulfato de dermatam mais sulfato de condroitina e heparina, ou seja, não devem haver impurezas. *Adequação do sistema*: o cromatograma obtido com a *Solução de referência (d)* não apresenta picos no tempo de retenção da heparina. Exemplo:



**A** – Cromatograma da solução de heparina SQR (Hep).

**B** – Cromatograma da solução padrão das misturas (DS - dermatam Sulfato – 12%; Hep - Heparina – 44% e OSC – sulfato de condroitina sobre-sulfatado – 54%).

**C** – Cromatograma de uma amostra reprovada pela presença de sulfato de condroitina sobre-sulfatado (OSC).

**D.** Responde às reações do íon cálcio (5.3.1.1).



## CARACTERÍSTICAS

**Características físicas.** Pó branco ou quase branco, moderadamente 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.** Adicionar cinco gotas de ácido tricloroacético a 20% (p/v) em 1 mL de solução aquosa da amostra a 1% (p/v). Não deve haver formação de precipitado ou turbidez.

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

**Nitrogênio (5.3.3.2).** Utilizar o *Método I, macrodeterminação*. No mínimo 1,3% e, no máximo, 2,5% de nitrogênio, calculado em relação à substância dessecada.

**Cálcio (5.3.2.7).** No mínimo 9,5% e, no máximo, 11,5% de cálcio, calculado em relação à substância dessecada, determinado em 0,2 g por *Titulação complexométrica (5.3.3.4)*.

**Perda por dessecação (5.2.9.1).** Determinar em estufa, sob vácuo, a 60 °C, por 3 horas. No máximo 5%.

**Cinzas sulfatadas (5.2.10).** No mínimo 28% e, no máximo, 41%.

**Impurezas nucleotídicas:** Dissolver 40 mg em 10 mL de água. A absorvância medida a 260 nm e o resultado não deve ser superior a 0,2.

## TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

**Endotoxinas bacterianas (5.5.2.2).** No máximo 0,03 UE/ UI de heparina.

## DOSEAMENTO

### **Determinação da potência.**

A atividade anticoagulante da heparina é determinada *in vitro*, comparando sua habilidade em condições específicas para retardar a coagulação, de um plasma ovino de referência ou plasma humano de referência, citratado e recalificado com a mesma capacidade de uma preparação de referência de heparina, calibrado em unidades internacionais.

Uma Unidade Internacional é a atividade contida em um montante indicado na norma internacional, que consiste de uma quantidade de heparina cálcica liofilizada obtida de mucosa intestinal de suínos. A equivalência em unidades internacionais do Padrão Internacional de Referência é indicada pela Organização Mundial de Saúde.

A heparina cálcica padrão de referência é calibrada em unidades internacionais, em comparação com um Padrão Internacional por meio do ensaio a seguir.

Realizar o ensaio utilizando registro mecânico da alteração da fluidez na agitação, tendo o cuidado de perturbar o mínimo da solução durante a fase inicial de coagulação (coagulômetro).

*Procedimento:* Os volumes descritos no texto são apresentados como exemplos e pode ser adaptado para o aparelho utilizado, desde que a relação entre os diferentes volumes seja respeitada. Diluir a heparina cálcica padrão de referência em uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) de modo a conter um número precisamente conhecido de Unidades Internacionais por mililitro e preparar uma solução da amostra similar à preparação para ser examinada, que deverá ter a mesma atividade. Usando uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v), preparar uma série de diluições em progressão geométrica de tal forma que o tempo de coagulação obtido com a menor concentração não seja inferior a 1,5 vezes o tempo de recalcificação em branco, e que sendo obtida a maior concentração seja dada uma curva em logaritmo dose-resposta satisfatória. Colocar 12 tubos em um banho-maria com água gelada, rotulando-os em duplicado: A1, A2 e A3 para as diluições das preparações a serem examinadas e P1, P2 e P3 para as diluições de preparação de referência. Para cada tubo adicionar 1 mL de plasma descongelado substrato e 1 mL de uma diluição adequada da preparação a ser examinada ou a preparação de referência. Após cada adição, misturar, mas não permitir a formação de bolhas. Tratar os tubos na ordem P1, P2, P3, A1, A2, A3, a transferência de cada tubo para um banho-maria a 37 °C, permite equilibrar a 37 °C por aproximadamente 15 minutos e adicionar a cada tubo 1 mL de uma diluição de cefalina ao qual foi adicionado um ativador adequado, tais como caolim de modo que um tempo de recalcificação adequado obtido no branco não é superior a 60 segundos. Quando o caolim é utilizado, deve ser preparado imediatamente antes do uso, uma mistura de volumes iguais de cefalina e de suspensão de caolim a 0,4% (p/v) protegido da luz em uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v). Exatamente depois de 2 minutos adicionar 1 mL de uma solução de cloreto de cálcio a 3,7 g/mL e registrar o tempo de coagulação e o intervalo em segundos entre esta última adição e o início da coagulação determinado pela técnica escolhida. Determinar o tempo de recalcificação do branco no início e no final do processo de uma forma similar, utilizando 1 mL de uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) no lugar de uma das diluições da heparina. Os dois valores obtidos no branco não devem diferenciar significativamente. Transforme o tempo de coagulação em logaritmos, utilizando o valor médio para os tubos em duplicatas. Repita o procedimento com diluições a fresco e realizar a incubação na ordem A1, A2, A3, P1, P2, P3. Calcular os resultados através dos métodos estatísticos habituais. Realizar de não menos de três ensaios independentes. Para cada ensaio preparar novas soluções de referência e a preparação para ser examinada e usar outro, recentemente descongelada porção de plasma. Realizar o ensaio de heparina. A potência estimada deve ser de não menos de 90% e não mais de 111% da potência declarada. Os limites de confiança da potência estimada devem ser não inferiores a 80% e não superiores a 125% da potência declarada ( $P = 0,95$ ).

### **Potência antifator IIa.**

*Tampão pH 8,4:* dissolver 6,1 g de trometamina, 10,2 g de cloreto de sódio, 2,8 g de edetato dissódico e, se necessário, entre 0 e 10 g de polietilenoglicol 6000 e/ou 2 g de albumina bovina em 800 mL de água. Ajuste com ácido clorídrico a um pH de 8,4, e diluir com água até 1000 mL.

*Nota:* 2 g de albumina humana podem ser substituídos por 2 g de albumina bovina.

*Solução Antitrombina:* reconstituir um frasco de antitrombina em água até obter uma solução de 5 UI/ mL antitrombínica. Diluir com *Tampão pH 8,4* para obter uma solução a uma concentração de 0,125 UI/mL antitrombínica.

*Solução de trombina humana:* reconstituir a trombina humana (Fator IIa) em água para dar 20 UI/mL de trombina, e diluir com *Tampão pH 8,4* para obter uma solução com uma concentração de 5 UI/mL de trombina.

**Nota:** a trombina deve ter uma atividade específica não menor que 750 UI/mg.

**Solução de substrato cromogênico:** preparar uma solução de um substrato da trombina adequado para o ensaio cromogênico amidolítico em água para obter uma concentração de 1,25 mM.

**Solução de parada:** preparar uma solução de ácido acético a 20% (v/v) em água.

**Soluções padrão:** reconstituir o conteúdo total de uma ampola de heparina de cálcio SQR em água e diluir com *Tampão pH 8,4* para obter pelo menos quatro diluições entre o intervalo de concentração de 0,005 e 0,03 unidade/ mL de heparina.

**Soluções de amostra:** proceder como indicado nas soluções para obter as concentrações de heparina de cálcio similar aos obtidos para as *Soluções padrão*.

Para cada diluição da *Solução padrão* ou da *Solução da amostra* devem ser realizadas em duplicatas. Rótulos numéricos devem ser colocados dependendo do número de repetições a serem testadas. Por exemplo: se houver cinco brancos a serem usados B1, B2, B3, B4 e B5; A1, A2, A3 e A4 para cada duplicada das amostras em testes e P1, P2, P3 e P4 para cada duplicada das soluções padrões em teste. Distribuir os espaços em branco sobre a série de tal maneira que representem com precisão o comportamento dos reagentes durante os experimentos.

**Nota:** Os tubos devem ser tratados na ordem B1, P1, P2, P3, P4, B2, A1, A2, A3, A4, B3, A1, A2, A3, A4, B4, P1, P2, P3, P4, B5.

Notar que, após cada adição de reagente, a solução incubada deve ser misturada sem permitir a formação de bolhas. Adicione duas vezes o volume (100 - 200 µL) de solução Antitrombina a cada tubo contendo um volume (50-100 µL), de *Tampão pH 8,4* ou uma diluição apropriada das soluções de amostra ou o padrão. Agitar, mas não permitir a formação de bolhas, incubar a 37 °C por pelo menos 1 minuto. Adicionar a cada tubo de 25-50 µL de *Solução de trombina humana*, e incubar por pelo menos 1 minuto. Adicionar 50 - 100 µL de *Solução de substrato cromogênico*. Notar que todos os reagentes, soluções padrão, e soluções de amostra devem ser pré-aquecidas a 37 °C pouco antes de usar.

Dois diferentes tipos de medições podem ser registrados:

**Medição "endpoint":** Parar a reação pelo menos após 1 minuto com 5-10 µL de *Solução de parada*. Medir a absorvância de cada solução a 405 nm através de um espectrofotômetro adequado. Um desvio padrão relativo sobre as leituras em branco tem que ser menor que 10%.

**Medição Cinética:** Seguindo a mudança na absorvância para cada solução sobre 1 minuto a 405 nm através de um espectrofotômetro. Calcular a variação de absorvância por minuto ( $\Delta OD/\text{minuto}$ ). Os brancos para a medição cinética também são expressos como  $\Delta OD/\text{minuto}$  e devem dar valores maiores em que são realizadas na ausência de heparina. O desvio padrão relativo sobre as leituras em branco deve ser inferior a 10%.

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 absorvância ou mudança de absorvância por minuto contra as concentrações em logaritmo das soluções de amostra e das soluções

padrões e calcular a potência da heparina de cálcio de referência em Unidades/mL utilizando métodos estatísticos para ensaios linha paralela. Expressar a potência de heparina cálcica 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 por minuto contra as concentrações das soluções de amostra e das soluções padrões e calcular a potência da heparina de cálcio de referência Unidades/mL utilizando métodos estatísticos para ensaios de relações entre inclinações. Expressar a potência de heparina cálcica em UI/mg, de base seca.

*Crítérios de aceitação:* A potência da heparina cálcica, calculada em base seca, é não é inferior a 180 unidades de heparina por mg.

### **Atividade antifator Xa.**

*Tampão pH 8,4:* dissolver 10,24 g de cloreto de sódio, 6,6 g de trometamina e 2,8 g de edetato dissódico em água. Se necessário, ajustar o pH para 8,4 com solução diluída de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

*Solução antitrombina:* reconstituir o conteúdo de uma ampola contendo antitrombina com água (ou conforme recomendado pelo fabricante). Diluir com *Tampão pH 8,4* de modo a obter solução a 1 UI de antitrombina por mL.

*Solução de fator Xa bovino:* reconstituir o conteúdo de uma ampola contendo fator Xa bovino com água (ou conforme recomendado pelo fabricante). Diluir a solução obtida em *Tampão pH 8,4*, de modo a obter uma solução com valores de absorvância entre 0,65 e 1,25 medidas em 405 nm, quando testadas conforme descrito abaixo, mas utilizando 30 µL de *Tampão pH 8,4* ao invés de 30 µL de *Solução padrão* ou *Solução amostra*.

A solução de fator Xa contém três unidades nano catalíticas por mL, mas pode variar dependendo do fabricante do factor Xa, ou o substrato utilizado.

*Solução de substrato cromogênico:* preparar uma solução cromogênica adequada para o teste amidolítico específico para fator Xa em água para obter uma concentração de cerca de 1 mM.

*Solução de parada:* preparar uma solução de ácido acético a 20% (v/v) em água.

*Solução amostra:* dissolver quantidade exata da amostra de heparina cálcica em *Tampão pH 8,4* e diluir com o mesmo para obter soluções contendo atividades aproximadamente iguais à *Solução Padrão*.

*Solução padrão:* utilizar padrão oficial de heparina. Pode ser utilizada outra preparação, cuja potência tenha sido calibrada frente ao padrão oficial. Reconstituir o conteúdo da ampola de heparina padrão oficial em água e misturar levemente até completa dissolução. Preparar diluições em *Tampão pH 8,4*, de forma a obter de cinco até sete soluções contendo atividades conhecidas de 0,375; 0,3125; 0,25; 0,188; 0,125; 0,0625 e 0,0313 em unidades de heparina por mL.

*Procedimento:* os volumes descritos podem ser adaptados para realização do ensaio em tubos ou microplacas, mantendo a relação entre os volumes. Executar o teste com cada *Solução padrão* e *Solução amostra* em duplicata. Para cada série de tubos plásticos em banho-maria a 37 °C, transferir 120 µL de *Tampão pH 8,4*. Separadamente transferir 30µL de diferentes diluições de soluções padrão ou de soluções amostra aos tubos. Adicionar 150 µL, para cada tubo, misturar e incubar por dois minutos. Adicionar 300 µL de *Solução substrato cromogênico*, pré aquecido a 37 °C por 15 minutos.

Adicionar 150 µL de *Solução de parada* em cada tubo e misturar. Preparar o branco para zerar o espectrofotômetro adicionando os reagentes em ordem inversa, começando com *Solução de parada* e terminando com a adição de 150 µL de *Tampão pH 8,4*, e excluindo as soluções padrão ou as soluções amostra. Registrar a absorvância medida em 405 nm contra o branco.

Construir um gráfico dos valores das absorvâncias das *soluções padrão* e as *soluções amostra* contra as concentrações de heparina em unidades. Construir retas separadas de melhor ajuste utilizando análise de regressão linear dos mínimos quadrados para as soluções padrão e as soluções amostra e determinar a inclinação de cada reta de regressão. Calcular a potência da heparina cálcica pela fórmula.

$$P \times \left( \frac{AS}{SP} \right)$$

em que

$P$  = potência do padrão de referência da heparina cálcica;

$SA$  e  $SP$  = são as inclinações das retas a partir das *Soluções amostra* e das *Soluções padrão*, respectivamente.

$$\left( \frac{\text{atividade anti-fator Xa}}{\text{potência anti-fator IIa}} \right)$$

Expressar a potência do antifator Xa da solução amostra como uma porcentagem da concentração de heparina determinada no Ensaio. Calcular a razão do antifator Xa contra potência do fator IIa pela fórmula. A razão entre atividade do antifator Xa com potência antifator IIa deve ser no mínimo, 0,9 e no máximo 1,1.

## EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Conforme legislação vigente.

## ROTULAGEM

Conforme legislação vigente.

## CLASSE TERAPÊUTICA

Anticoagulante.