

IZABELA GIMENES LOPES

COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE PIROGÊNIO *IN VIVO* DESCRITOS NAS
FARMACOPEIAS BRASILEIRA E EUROPEIA: INTERFERÊNCIA NA
INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

ESPECIALIZAÇÃO

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2011

COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE PIROGÊNIO *IN VIVO* DESCRITOS NAS
FARMACOPEIAS BRASILEIRA E EUROPEIA: INTERFERÊNCIA NA
INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Izabela Gimenes Lopes

Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos,
Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Cristiane Caldeira da Silva
Octavio Augusto França Presgrave

Rio de Janeiro
2011

Izabela Gimenes Lopes

Comparação dos métodos de pirogênio *in vivo* descritos nas farmacopeias
brasileira e europeia: interferência na interpretação dos resultados

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta pelos professores e tecnologistas do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado em 29 de abril de 2011

Prof. MSc. João Carlos Borges Rolim de Freitas (INCQS/Fiocruz)

Prof.^a. Dra. Rosaura França de Farias Presgrave (INCQS/Fiocruz)

Prof. MSc. Sérgio Alves da Silva (INCQS/Fiocruz)

Prof.^a. MSc. Clarice Lima do Canto Abreu (INCQS/Fiocruz)

MSc. Cristiane Caldeira da Silva (INCQS/Fiocruz) - Orientadora

MSc. Octavio Augusto França Presgrave (INCQS/Fiocruz) - Orientador

Rio de Janeiro

2011

Lopes, Izabela Gimenes

Comparação dos métodos de pirogênio *in vivo* descritos nas farmacopeias brasileira e europeia: interferência na interpretação dos resultados / Izabela Gimenes Lopes. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2011.

xiii, 46 f.,il., tab.

Trabalho de conclusão de Curso (Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2011.

Orientadores: Cristiane Caldeira da Silva; Octavio Augusto França Presgrave.

1. Teste de Pirogênio *in vivo*. 2. Farmacopeia Brasileira. 3. Farmacopeia Europeia. I. Comparação dos métodos de pirogênio *in vivo* descritos nas farmacopeias brasileira e europeia: interferência na interpretação dos resultados

Comparison of the pyrogen *in vivo* methods described in brazilian and european pharmacopoeias: interference in the interpretation of results.

“Você tem que estar preparado para se queimar em sua própria chama:
como se renovar sem primeiro se tornar cinzas?”

F. Nietzsche (Assim Falou Zaratustra)

AGRADECIMENTOS

A Deus toda a honra e glória. Agradeço pelo dom da vida e possibilidade de completar mais uma etapa em minha carreira.

Aos meus pais pela educação e lição de vida. Nunca desistir, sempre continuar e avançar.

Ao meu esposo Leonardo pela força, compreensão e apoio de todos os momentos.

Aos meus irmãos Filipe e Davi pelo incentivo.

Aos meus orientadores Octavio Augusto F. Presgrave pela confiança de entregar a mim este tema e Cristiane Caldeira da Silva por orientar e acompanhar minha jornada desde 2003. Obrigada por exercerem com fidelidade o papel da orientação.

Aos meus colegas de trabalho João Carlos Borges Rolim de Freitas (Profeta), Saulo de Tasso Borges Nogueira e Adigerson Ferreira Pires da Costa pelo apoio e por levarem a rotina dos testes em quanto eu estava em aula.

As colegas de departamento Eloisa e Rosaura, que completaram suas carreiras e deixam saudades; Ronald e Taline pela ajuda nas revisões, e às alunas Nathália, Amanda e Gabrielle.

À amiga Vanessa pelo apoio de todas as horas.

Aos colegas da biblioteca do INCQS em especial o Alexandre Medeiros pela atenção e ajuda nas pesquisas e bibliografias.

Aos colegas de classe pelos momentos vividos de muito aprendizado e companheirismo.

Ao professor Sérgio Alves da Silva pela ajuda na parte de geração dos dados no computador.

Aos coordenadores e professores do Programa de Pós-Graduação do INCQS.

Ao chefe de departamento Fernando Faria Fingola pela liberação para cursar esta especialização.

Aos participantes da banca examinadora.

RESUMO

Todos os produtos injetáveis de uso humano devem ser livres de pirogênio. O teste de pirogênio *in vivo* é preconizado em diversas farmacopeias. Ele é baseado na reação de febre dos coelhos. A Farmacopeia Brasileira segue o mesmo método da Americana, porém diferem da Europeia no número de coelhos, número de etapas do ensaio e na interpretação da análise dos resultados. Este estudo comparou os métodos da Farmacopeia Brasileira e Europeia e avaliou se estas diferenças podem interferir no resultado final das análises, identificando qual foi o critério mais rigoroso. As concordâncias e/ou discordâncias entre os resultados das farmacopeias foram analisadas através: a) 44 amostras do Setor de Pirogênio do Departamento de Farmacologia e Toxicologia/INCQS com resultado de repetição. b) geração de dados hipotéticos utilizando o valor limite de febre de 0,5 °C e 451 combinações numéricas por modelagem em programa computacional simulando o primeiro ensaio. Para todos os animais com elevação individual de temperatura igual a 0,5°C, a Farmacopeia Brasileira teve o resultado “pirogênio” para uma amostra enquanto que a Europeia teve o resultado “livre de pirogênio”, demonstrando que a Farmacopeia Europeia não considera a elevação de 0,5°C como indicador de febre. Tanto os dados analisados da rotina como os dados gerados matematicamente demonstraram que a Farmacopeia Brasileira foi mais rígida em baixas elevações de temperatura (até o somatório de 1,15°C). Entre o somatório de 1,2°C e 2,6°C as farmacopeias possuem o mesmo resultado encaminhando o produto para o “próximo estágio”. A Farmacopeia Europeia foi mais rigorosa em altas elevações de temperatura (somatório acima de 2,7°C). Os resultados indicam que as diferenças metodológicas podem gerar incertezas nas avaliações dos protocolos de acordo com o país em que o produto foi fabricado e interferem na interpretação dos resultados.

ABSTRACT

All injectable products for human use should be free of pyrogen. The pyrogen test in vivo is recommended in various pharmacopoeias. It's based on the fever reaction of rabbits. The Brazilian Pharmacopoeia follows the same method of the American, but differs the European in the number of rabbits, the number of steps in the test and the interpretation of results analysis. This study compared both methods and identified if these differences can affect the final result of analysis, evaluating what the more stringent criterion was. The agreement and / or disagreement between the results of pharmacopoeias were analyzed by: a) 44 samples from Sector pyrogen Department of Pharmacology and Toxicology / INCQS with the result of repetition. b) hypothetical data using the threshold value of fever of 0.5°C and 451 combinations by numerical modeling in a computer program simulating the first test. For all animals with individual temperature rise equal to 0.5°C, the Brazilian Pharmacopoeia had the result "pyrogen" for a sample whereas the European had the result "pyrogen free", demonstrating that the European Pharmacopoeia does not consider the elevation of 0.5°C as an indicator of fever. Both the routine data and the generated mathematically showed that the Brazilian Pharmacopoeia was more rigid at low temperature rise (up to the sum of 1.15°C). Between the sum 1.2 °C and 2.6 °C the pharmacopoeias had the same result forwarding the product to "go to next stage". The European Pharmacopoeia was stricter in high temperature rise (sum of above 2.7°C). The results indicate that the methodological differences may generate uncertainty in the evaluations of the protocols according to the country where the product was manufactured and the interference in the interpretation of results.

LISTA DE SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DFT	Departamento de Farmacologia e Toxicologia
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EP	<i>European Pharmacopoeia</i> (Farmacopeia Europeia)
EUA	Estados Unidos da América
FB	Farmacopeia Brasileira
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i> (Conferência Internacional de Harmonização)
IL- 6	Interleucina-6
IL-1 β	Interleucina-1beta
INCQS	Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde
JP	<i>Japanese Pharmacopoeia</i> (Farmacopeia Japonesa)
LAL	Lisado de Amebócitos de <i>Limulus</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAT	<i>Monocyte Activation Test</i> (Teste de Ativação de Monócitos)
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PNI	Programa Nacional de Imunização
PVC	Policloreto de Vinila
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SQR	Substâncias Químicas de Referência
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral alfa)
UE/Kg	Unidade de Endotoxina/Quilograma
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i> (Farmacopeia dos Estados Unidos da América)
USP-NF	<i>United States Pharmacopoeia – National Formulary</i> (Formulário Nacional da Farmacopeia dos Estados Unidos da América)
VIT	Varição Individual de Temperatura

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Quantitativo de amostras analisadas pelo setor de pirogênio – DFT/INCQS entre os anos de 2006 a 2010 (Fonte: caderno de dados do setor de pirogênio).	3
FIGURA 2	Sequência de fotos do teste <i>in vivo</i> . No INCQS, os animais são colocados em gaiolas de contenção (A), os eletrodos são colocados no reto do animal (B) e o produto é injetado na veia marginal da orelha (C). O registro das temperaturas é realizado pelo equipamento <i>Pyromon</i> ® ELLAB, durante o período de três horas (D).	8
FIGURA 3	Representação hipotética onde todos os animais apresentariam VIT = 0,5°C, com avaliação segundo as Farmacopeias Brasileira e Europeia.	23
FIGURA 4	Frequência do somatório das VITs em relação aos dados gerados onde as farmacopeias diferem nos resultados de acordo com o primeiro teste.	25
FIGURA 5	Frequência do somatório das VITs em relação aos dados gerados onde as farmacopeias possuem os mesmos resultados de acordo com o primeiro teste.	26
FIGURA 6	Frequência do somatório das VITs em relação às amostras duvidosas da rotina do Setor de Pirogênio de acordo com o primeiro teste. Concordância e discordância de resultados.	27

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Diferenças metodológicas entre as Farmacopeias Brasileira e Europeia.	10
QUADRO 2	Critérios de avaliação da contaminação pirogênica (método em coelhos) das Farmacopeias Brasileira e Europeia (Adaptado de TSCHUMI, 2003).	17

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Critérios de insatisfatoriedade do produto segundo a metodologia da Farmacopeia Europeia para o somatório das VITs e a média das VITs por animal utilizado em cada ensaio.	20
TABELA 2	Análise da amostra de Parenteral de Grande Volume segundo a metodologia das Farmacopeias Brasileira e Europeia.	21
TABELA 3	Análise da amostra de Hemoderivado segundo a metodologia das Farmacopeias Brasileira e Europeia.	22
TABELA 4	Dados gerados matematicamente do primeiro ensaio.	24

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1. 1 – As farmacopeias	3
1. 1. 1 – Farmacopeia Brasileira	6
1. 2 – O teste de pirogênio em coelhos	8
1. 3 – Métodos alternativos ao teste <i>in vivo</i>	11
2 – JUSTIFICATIVA	14
3 – OBJETIVOS	15
3. 1 – Objetivo geral	15
3. 2 – Objetivos específicos	15
4 – METODOLOGIA	16
4. 1 – Critérios da Farmacopeia Brasileira	16
4. 2 – Critérios da Farmacopeia Europeia	16
4. 3 – Levantamento das amostras analisadas no Setor de Pirogênio do DFT/INCQS	17
4. 4 – Geração de dados hipotéticos	18
4. 4. 1 – VITs de 0,5°C em todas as etapas dos ensaios	18
4. 4. 2 – Dados gerados simulando as VITs do primeiro ensaio	18
5 – RESULTADOS	20
5. 1 – Avaliação dos critérios das Farmacopeias	20
5. 2 – Análise dos dados da rotina do setor de pirogênio	21
5. 3 – Avaliação dos dados hipotéticos	22
5.3.1 – VITs dos ensaios iguais a 0,5°C	22
5. 3. 2 – VITs do primeiro ensaio geradas por simulação	24
5.4 – Avaliação da concordância e/ou discordância entre os resultados dependendo do critério utilizado	25
6 – DISCUSSÃO	28
7 – CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32
APÊNDICE I - Dados brutos referente aos valores gerados por modelagem	36

1. INTRODUÇÃO

Todos os produtos injetáveis de uso humano sujeitos à Vigilância Sanitária devem ser livres de pirogênios (HARTUNG et al, 2001; PRESGRAVE, 2003). Este termo tem origem no grego **pyro** que significa “fogo” e **genesis** que significa “criar ou resultar” sendo, portanto qualquer substância que tenha a capacidade de induzir febre (PEARSON, 1985; SCHINDLER et al., 2009).

Os pirogênios podem ser divididos em dois grupos, os exógenos os quais são produzidos externamente ao hospedeiro, e os endógenos, que são originados nas células de defesa. São exemplos de pirogênios exógenos bactérias, vírus, fungos, materiais antigênicos e alguns medicamentos (HARTUNG et al., 2001; HOFFMANN et al., 2005 a).

Os pirogênios endógenos são produzidos pelo organismo quando um microrganismo invade um hospedeiro e entra na corrente sanguínea, estimula leucócitos a sintetizarem e liberarem um grupo de moléculas, chamadas citocinas. As citocinas pertencem a uma classe de imunopeptídeos, das quais as principais são a interleucina-1 β (IL-1 β), a interleucina-6 (IL- 6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e prostaglandina E₂ (PGE₂). Estas substâncias atuam no centro termorregulador do organismo e elevam a temperatura corporal causando febre (HARTUNG et al., 2001; HOFFMANN et al., 2005 a; NOGUEIRA, 2009).

Pode-se eliminar a presença de quase todos os microorganismos através dos processos de esterilização. Entretanto, o lipopolissacarídeo (LPS) componente da parede celular de bactérias Gram-negativas possui uma característica termo-estável e só pode ser eliminado, através de processos de despirogenização. O processo de despirogenização mais utilizado no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) consiste na esterilização por calor seco onde o material ou produto é exposto a temperatura em estufa acima de 250°C por 30 mim (HARTUNG et al., 2001; HOFFMANN et al., 2005 a; SCHINDLER et al., 2009).

A contaminação de produtos injetáveis por pirogênios pode ser perigosa, sendo considerado um grave problema de Saúde Pública por causar reações febris, choque pirogênico, insuficiência de órgãos e até morte (SCHINDLER et al., 2009).

O INCQS, da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) como laboratório oficial da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é responsável pelo controle da qualidade dos produtos injetáveis e age em todo o território nacional, atendendo ao Sistema Único de Saúde (SUS) por meio do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) atuando como referência nacional para questões científicas, tecnológicas e contribui também nas áreas de pesquisa relativas ao controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. Para tal, segue o especificado em cada registro e de acordo com a PORTARIA 109/1993 (BRASIL, 1993; INCQS, 2009; MELANDRI et al., 2010).

Para garantir a ausência da contaminação pirogênica, um dos ensaios preconizados é o Teste de Pirogênio em coelhos, tanto no controle final da produção, quanto dos produtos comercializados, os quais são enviados aos laboratórios oficiais para análise (FREITAS, 2008).

O Setor de Pirogênio do Departamento de Farmacologia e Toxicologia - DFT/INCQS recebe em média 250 amostras por ano para a realização de testes de pirogênio *in vivo* (Figura 1). Medicamentos e hemoderivados somente chegam para análise através de denúncias ou de programas estabelecidos com Secretarias Municipais ou Estaduais de Saúde. No caso específico de soros e algumas vacinas nacionais e importadas, as análises são realizadas lote a lote como parte do Programa Nacional de Imunização (PNI). Além desses, também são analisados dispositivos médicos como bolsas de sangue, seringas, equipos, filtros e recipientes plásticos (MELANDRI et al., 2010).

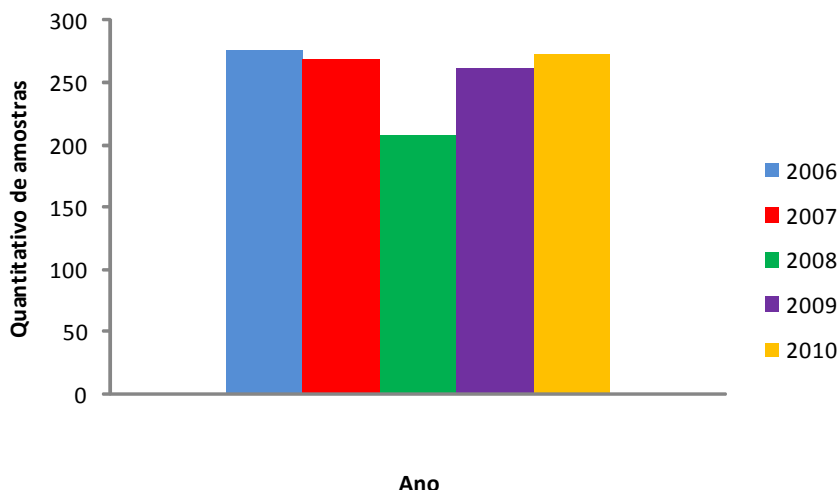


Figura 1: Quantitativo de amostras analisadas pelo setor de pirogênio-DFT/INCQS entre os anos de 2006 a 2010 (Fonte: caderno de dados do setor de pirogênio).

1.1 – As Farmacopeias

O termo *farmacopeia* tem origem no grego, Pharmakon (*φάρμακου*) = medicamento ou veneno, e Poeia (*ποιοζ*) = fabricante e fabricação. As farmacopeias são códigos farmacêuticos oficiais de um país, nos quais são estabelecidos a identificação, os padrões de qualidade e os métodos de análise dos fármacos em uso (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; ANVISA, 2010).

As farmacopeias se dedicam também a outras atividades, tais como: produção e certificação de Substâncias Químicas de Referência (SQR) e padrões, elaboração de formulários nacionais, apoio e incentivo à formação e aperfeiçoamento de recursos humanos na área de controle da qualidade, apoio à pesquisa científica e tecnológica (ANVISA, 2010; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007 a).

As farmacopeias de caráter oficial e adoção obrigatória começaram a surgir no final do século XVIII e início do século XIX. Assim, foram publicadas as primeiras edições das farmacopeias portuguesa (1794), holandesa (1805), francesa (1818) e americana (1820) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

A Farmacopeia Americana foi estabelecida em 1 de janeiro de 1820, sendo sua primeira edição publicada em 15 de dezembro do mesmo ano. Em 1848 a legislação federal reconhece a USP como um compêndio oficial. De 1820 a 1942 as revisões foram publicadas em intervalos de 10 anos, de 1942 a 2000 em intervalos de 5 anos e a partir de 2002 as revisões são realizadas anualmente (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009 a).

A Farmacopeia Americana tem a missão de garantir a qualidade dos produtos utilizados pela população por meio de padrões públicos e programas que ajudam a garantir a qualidade, a segurança e os benefícios de medicamentos e alimentos. Desta forma, tem o objetivo de ser líder no fomento da saúde pública ao criar uma base única de conhecimentos. A Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos dos Estados Unidos designa a USP-NF (Formulário Nacional da Farmacopeia Americana) como o compêndio oficial para os medicamentos comercializados nos Estados Unidos (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

A Farmacopeia Europeia foi estabelecida em 1964 através de uma Convenção pelo Conselho Europeu em conjunto com seis países (Bélgica, França, Republica Federativa da Alemanha, Itália, Luxemburgo, Países Baixos) e o Reino Unido. Sua primeira edição foi publicada em 1969 . A segunda edição foi estabelecida em 1971 e a terceira em 1997. A Farmacopeia Europeia passou por um notável desenvolvimento, desde as publicações iniciais até as 4^{as}, 5^{as} e 6^{as} edições, que seguem o atual ciclo de três anos de publicação revisada com suplementos de três vezes ao ano. As monografias gerais e específicas junto com outros textos são aplicadas aos 37 Estados Membros da Convenção da Farmacopeia Europeia incluindo a União Europeia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 1969; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 1971; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007a).

A Farmacopeia Europeia possui a missão de promover a saúde pública mediante a concessão de padrões para uso da qualidade dos medicamentos por profissionais de saúde e outras áreas, facilitar a livre circulação e assegurar a

qualidade dos medicamentos na Europa e seus componentes que são importados ou exportados. As monografias e outros textos da Farmacopeia Europeia são designados para atenderem às necessidades das entidades regulatórias, no controle de qualidade de medicamentos e de seus constituintes e para os fabricantes de matérias-primas e produtos medicinais (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007a)

As revisões das Farmacopeias são mantidas com o objetivo de torná-las atualizadas levando em consideração as mudanças nos produtos comercializados e o progresso científico. São realizadas por membros de grupos de trabalho de agências reguladoras, laboratórios oficiais de controle, fabricantes de produtos farmacêuticos e químicos, universidades e instituições de pesquisa. As monografias são submetidas à consulta pública, onde são divulgadas nos informes técnicos as propostas de revisão. As contribuições são encaminhadas juntamente com a justificativa técnica. As monografias que não foram substituídas ou excluídas por revisão continuam em vigor (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007a; ANVISA, 2010).

Em 1990 foi criada a Conferência Internacional de Harmonização (ICH), um programa trilateral para a harmonização dos testes entre as farmacopeias Europeia, Americana e Japonesa. Este programa visa reduzir o custo total da pesquisa farmacêutica mundial, diminuindo o tempo necessário para novos produtos tornarem-se disponíveis. Os textos são elaborados por coordenações formadas nas três farmacopeias e encaminhados para consulta pública nos locais de origem (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007a).

1.1.1 - Farmacopeia Brasileira

O desenvolvimento da farmácia no Brasil se deu a partir das trocas culturais entre os conhecimentos dos europeus de formação farmacêutica e os conhecimentos dos índios nativos que contribuiu para a constituição da farmacopeia colonial ou ciência farmacêutica brasileira, que se fundamentou somente em meados dos anos oitocentos (ABREU, 2006).

O Brasil Colônia, até a Independência, em 1822, adotava a *Pharmacopéia Geral para o Reino e Domínios de Portugal*, a Farmacopeia Portuguesa, de 1794 (SILVA, 2000; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Após a Independência, foi utilizado, além desta, o *Codex Medicamentarius* francês. O Decreto nº 828 de 29/09/1851 estabelece uma lista de livros que as farmácias deveriam possuir, entre elas, a *Farmacopeia Portuguesa* de 1794, o *Codex Francês* e o *Código Farmacêutico Lusitano* (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; ANVISA, 2010).

A obrigatoriedade do uso da farmacopeia só se estabeleceu através do Decreto nº 8.387, de 19/01/1882, onde afirma que "para a preparação dos remédios oficiais seguir-se-á a farmacopeia francesa, até que esteja composta uma farmacopeia brasileira" (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; SILVA, 2000).

Em 1926, as autoridades sanitárias do país aprovaram a proposta de um Código Farmacêutico Brasileiro através do Decreto nº 17.509, de 04/11/1926, apresentada pelo Farmacêutico e Professor de Farmácia Rodolpho Albino Dias da Silva. Aprovado pelas autoridades sanitárias da época, esse Código foi oficializado a partir de 15 de agosto de 1929 e tornou-se a primeira edição da Farmacopeia Brasileira. Obra de um único autor, a primeira edição da FB equiparava-se às Farmacopeias dos países tecnologicamente desenvolvidos, revelando-se pela precisão das monografias, porém diferenciava-se das demais por conter descrições de mais de 200 plantas medicinais, a maioria delas de origem brasileira, não existente em nenhuma outra farmacopeia (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; ANVISA, 2010).

Quase trinta anos após a primeira edição, a segunda edição da Farmacopeia Brasileira foi publicada em 1959 (Decreto Federal nº 45.502, de 27/02/1959) decorrente de cinco anos de trabalho de dez subcomissões especializadas. A segunda edição incorporou as aquisições decorrentes da própria atualização da farmacologia e fixou um período de 10 anos para as próximas revisões. Mais de quinze anos depois, a terceira edição foi oficializada em 1976 (Decreto nº 78.840 de 25/11/1976) e sua revisão foi fixada no prazo de cinco anos. Com o apoio do Conselho Federal de Farmácia, foi publicada em 1988 (Decreto nº 96.607, de 30/08/1988) a quarta edição a qual procurou sanar as deficiências da edição anterior e adotar métodos modernos de análise, compatíveis com a realidade nacional. Esta edição foi sendo atualizada por vários fascículos até 2005 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Este mesmo decreto declara que “na elaboração de medicamentos e insumos farmacêuticos serão observadas as normas e condições estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira e seus fascículos” e que “o fármaco ou adjuvante de fabricação não incluído na Quarta Edição da Farmacopeia Brasileira será analisado na forma prevista em outros códigos oficiais” (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

No caso de haver necessidade de adoção de farmacopeia estrangeira, a resolução da Anvisa nº37 de 6/7/2009, resolve que, na ausência de monografia oficial de matéria-prima, formas farmacêuticas, correlatos, métodos gerais, como na ausência de substâncias químicas de referências inscritas na Farmacopeia Brasileira, poderá ser adotado consecutivamente monografia oficial, última edição ou substância química de referência certificada pelos compêndios internacionais. Neste caso podemos citar o uso da Farmacopeia Alemã, Farmacopeia Americana, Farmacopeia Argentina, Farmacopeia Britânica, Farmacopeia Europeia, Farmacopeia Francesa, Farmacopeia Internacional, Farmacopeia Japonesa, Farmacopeia Mexicana e Farmacopeia Portuguesa. Em relação à não concordância de resultados entre métodos analíticos de insumos ou produtos farmacêuticos, a Comissão da Farmacopeia Brasileira julgará os casos (ANVISA, 2010).

1.2 - O teste de pirogênio em coelhos

O teste de pirogênio em coelhos se baseia no mesmo princípio da febre humana. O produto a ser testado é injetado na veia marginal da orelha dos animais e a variação da elevação de temperatura é o parâmetro que determina a contaminação (Figura 2) (WILLIAMS, 2007).

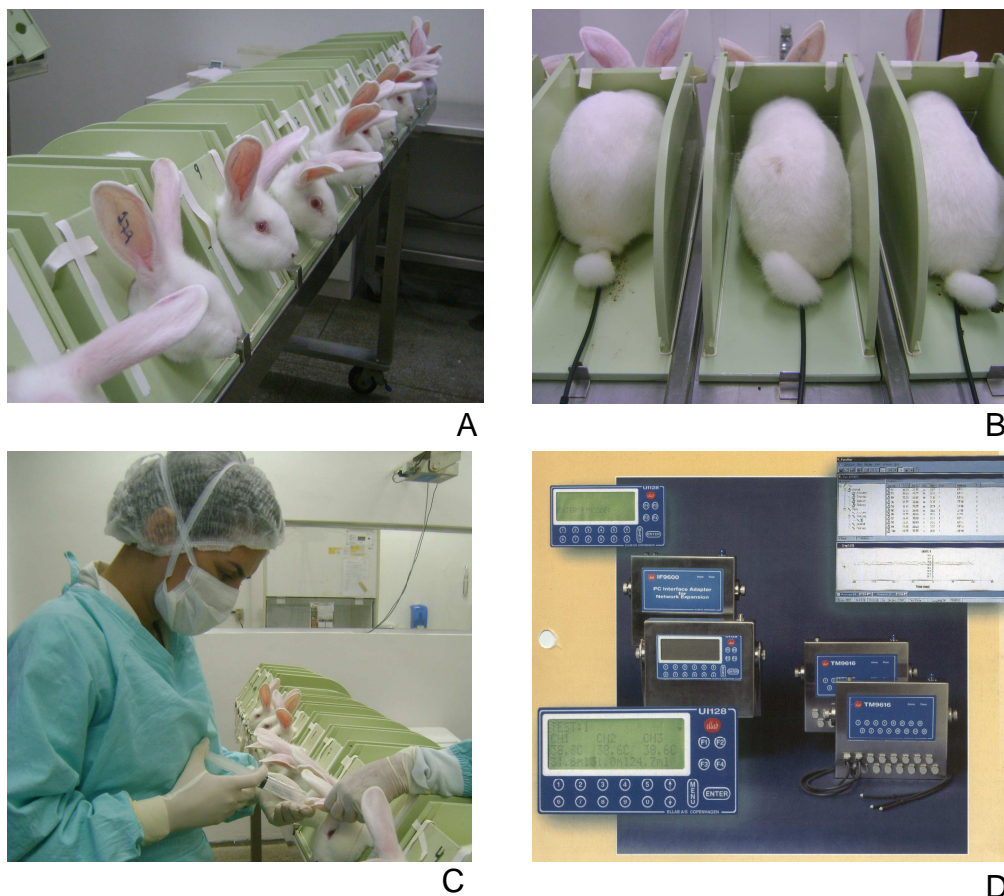


Figura 2: Sequência de fotos do teste *in vivo*. No INCQS, os animais são colocados em gaiolas de contenção (A), os eletrodos são colocados no reto do animal (B) e o produto é injetado na veia marginal da orelha (C). O registro das temperaturas é realizado pelo equipamento *Pyromon*® ELLAB, durante o período de três horas (D).

O teste de Pirogênio *in vivo* tornou-se farmacopeico na década de 1940 como um procedimento de controle analítico para a detecção de febre causada por contaminação de produtos (HARTUNG et al., 2001).

Em 1941 o Comitê de Revisão da Farmacopeia Americana autorizou o Subcomitê 3 em Ensaio Biológicos a iniciar o primeiro estudo colaborativo para o Ensaio de Pirogênio sob a direção de Henry Welch. Os resultados destes estudos foram publicados em 1943. Ainda durante o desenvolvimento deste estudo, o primeiro método oficial para detecção de pirogênio foi incorporado à 12^a edição da Farmacopeia Americana no ano de 1942. Apesar de algumas mudanças terem sido incorporadas no método apenas em 2001, o teste em coelhos segue o mesmo formato básico do teste original e é considerado o melhor e mais seguro ensaio de controle da qualidade para a detecção de contaminantes em produtos injetáveis (WILLIAMS, 2007).

Em 1990 a Convenção dos Estados Unidos da América (EUA) publicou um estudo colaborativo com 12 laboratórios com objetivo de comparar a resposta do teste de pirogênio em coelhos na preparação de dois padrões de referência de endotoxinas de *E.coli*. Este estudo demonstrou que para refletir o limiar humano da dose pirogênica de 5,0 UE/kg ou 1,0 ng/Kg de *E.coli* (055:B5) seria necessária a mudança do critério de 0,6°C para 0,5°C, alterando o intervalo de detecção da temperatura do teste de 1 hora para 30 min durante o período de 3 horas (HOESCHSTEIN et al., 1990).

Apenas em 2001, a Farmacopeia Americana (USP 24/NF19) modificou os critérios de avaliação do teste, tornando-os mais rigorosos, considerando como febre a variação individual de temperatura igual ou superior a 0,5°C, substituindo o critério anterior de igual ou superior a 0,6°C e alterou o intervalo de detecção da temperatura do teste para 30 min durante o período de 3 horas (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2000 b).

Em 1971, o teste de pirogênio foi publicado na segunda edição da Farmacopeia Europeia. O método segue até hoje sem nenhuma alteração (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 1971).

O teste de pirogênio foi publicado pela primeira vez na Farmacopeia Brasileira em sua 3^a edição, 1976. Em 2003, a Farmacopeia Brasileira

incorporou as mesmas mudanças de critérios da Farmacopeia Americana no fascículo 5 da 4ª edição (2003), seguindo desta mesma forma até os dias de hoje (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1976; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003).

Os critérios da Farmacopeia da Brasileira, assim como da Americana, diferem da Europeia. Estas diferenças residem no número de animais utilizados, número de repetições por amostra, e no critério de aceitação do produto (HOFFMANN et al., 2005 b).

A Farmacopeia Brasileira preconiza a realização do pré-teste ou treino com os animais sem a administração de qualquer produto. Para a realização do teste utiliza-se até oito animais por amostra em até dois ensaios, onde são utilizados três coelhos no primeiro e cinco coelhos no segundo, no qual o parâmetro utilizado para avaliação de uma amostra é o número de animais apresentando VIT $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$ (até três animais) e o somatório das VITs dos 8 (oito) animais no segundo teste, que não deve exceder $3,3^{\circ}\text{C}$. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

A Farmacopeia Europeia preconiza o pré-teste com administração de uma solução de cloreto de sódio apirogênico como controle negativo. Para a realização do teste podem ser utilizados até 12 coelhos por amostra divididos em até 4 ensaios de três animais, no qual o parâmetro utilizado é o somatório das VITs em cada etapa com três animais (Quadro 1) (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2007 b).

Quadro 1: Diferenças metodológicas entre as Farmacopeias Brasileira e Europeia.

Diferenças	Farmacopeia Brasileira	Farmacopeia Europeia
Nº Máximo de animais	8	12
Nº Máximo de ensaios	2	4
Critério de aceitação do produto	VIT $\leq 0,5^{\circ}\text{C}$ e somatório total	Somatório por etapa

1.3 - Métodos alternativos ao teste *in vivo*

A publicação do livro “*The principles of humane experimental technique*” pelos cientistas Russel e Burch (1959) contribuiu para o início das pesquisas em alternativas e implementou no meio científico os princípios éticos da experimentação animal, conhecido como os 3Rs – *Reduction, Refinement and Replacement* - que significa a redução do número de animais em experimentos, aprimoramento ou refinamento de técnicas para minimizar o sofrimento, mantendo o bem-estar animal e o uso de alternativas para a substituição de métodos *in vivo* por *in vitro* (BALLS, 2009).

No caso do teste de Pirogênio *in vivo* existem duas alternativas descritas em Farmacopeias que são o Teste de Endotoxina Bacteriana ou Lisado de Amebócitos de *Limulus* (LAL) e o Teste de Ativação de Monócitos (Monocyte Activation Test – MAT) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2009 a; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2009 b; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

O Teste de Endotoxina Bacteriana baseia-se na capacidade da endotoxina reagir com o lisado das células sanguíneas (hemolinfa) do caranguejo-ferradura *Limulus polyphemus*. O nome do teste se deu ao fato de detectar apenas endotoxinas e possui as vantagens de utilizar matriz biológica de animal invertebrado, ser sensível, possuir menor custo e ter rápida execução de análise, podendo ser executado para radiofármacos. Porém, não pode ser utilizado para grande parte dos produtos biológicos por sofrer ação de interferentes e, portanto não pode ser considerado um substituto completo do teste em coelhos (HARTUNG et al., 2001; SHINDLER et al, 2009). Nos Estados Unidos, os caranguejos são retirados da natureza para sangria e devolvidos, porém este procedimento causa morte de cerca de 30.000 *Limulus* por ano (HOFFMANN et al., 2005 a; SCHINDLER et al., 2009; BACHINSKI et al., 2010).

O Teste de Ativação de Monócitos foi recentemente incorporado a Farmacopeia Europeia e baseia-se no mesmo princípio do teste em coelhos, ou seja, no mecanismo da febre. Através deste processo mimetiza-se uma parte deste mecanismo, onde possíveis contaminantes presentes na amostra quando

em contato com sangue total humano induzem a liberação de citocinas, produzidas por monócitos. Este mesmo processo pode ocorrer quando se utiliza cultura de linhagens celulares monocíticas. As citocinas principalmente IL-1 β e IL-6 são medidas por kits comerciais por Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA (HARTUNG et al., 2001; CALDEIRA et al., 2005; PRESGRAVE, 2003; PRESGRAVE, et al., 2005; SCHINDLER et al., 2009).

Apesar das vantagens em detectar todos os tipos de pirogênios e não utilizar animais, o Teste de Ativação de Monócitos não pode ser considerado até o momento um substituto completo para o teste *in vivo*, sendo reconhecido pelos órgãos regulatórios apenas para detectar endotoxinas. Além disso, só é permitido seu uso desde que fique demonstrada a equivalência de cada produto ao teste *in vivo* em conformidade com a regulamentação aplicável. A necessidade de mais estudos para outros tipos de pirogênios e falta de validação internacional para produtos como os imunobiológicos, fez com que tenha sido incorporado como um terceiro teste, sem substituir o teste em coelhos ou o LAL, (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2009 a; SCHINDLER et al., 2009, MELANDRI et al., 2010).

Devido às limitações do LAL e as recomendações em relação ao uso do MAT, a redução do número de animais no teste de pirogênio *in vivo* pode ser uma alternativa para contornar o grande número de coelhos utilizados (MELANDRI et al., 2010; FREITAS, 2008; NOGUEIRA, 2009).

O teste de pirogênio *in vivo* ainda não possui método alternativo farmacopeico que possa substituí-lo totalmente. Nos casos onde a substituição dos animais ainda não é possível, o conceito da redução (dentro dos princípios dos 3Rs de Russel e Burch) segue como alternativa estratégica ao uso de animais, já que o Ensaio de Endotoxina e os testes de Ativação de Monócitos são modelos de substituição que, no momento, ainda não podem ser aplicados para produtos biológicos e vacinas (FREITAS, 2008; SCHINDLER et al., 2009).

A Farmacopeia Brasileira não recomenda a reutilização de coelhos para produtos biológicos devido à falta de estudos anteriores, porém mantém as

condições de reutilização de animais para os demais produtos (MELANDRI, et al., 2010). Desta forma, quando um ensaio é considerado negativo, os animais podem ser reutilizados, respeitando interstício de 48 horas. No caso de teste positivo, deve-se obedecer a um intervalo de 14 dias para que os mesmos tornem a ser utilizados em novo ensaio (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2009 b; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2007 b).

A literatura carece de trabalhos referentes à redução de animais no teste de pirogênio *in vivo* para produtos biológicos. Durante a “Primeira oficina de Ensaio Biológicos” em Cuba foi apresentado um trabalho comprovando a possibilidade de reutilizar três ou quatro vezes os animais nos testes de pirogênio para a vacina anti-hepatite B em período de uma semana, reduzindo em até um terço o número de animais (BOURG et al., 1997). Trabalhos recentes realizados no INCQS têm mostrado que, em relação a soros hiperimunes, coelhos administrados com Soro Antibotrópico, Antirábico e Antitetânico de resultado negativo podem ser reutilizados até quatro vezes no período de uma semana, respeitando os intervalos de 48 horas entre as administrações. Tal estudo reduziu em até 70% o número de coelhos utilizados, contribuindo de forma significativa para a diminuição dos custos do ensaio (FREITAS, 2008). Nogueira (2009) realizou o mesmo desenho experimental que Freitas (2008) modificando o produto testado pela Vacina Antimeningocócica AC de resultado negativo demonstrando que o número de coelhos foi reduzindo também em 70% (NOGUEIRA, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

O teste de pirogênio *in vivo* é preconizado nas Farmacopeias como teste de segurança imprescindível para a avaliação do controle da qualidade de produtos injetáveis, sendo uma das ações da Vigilância Sanitária.

Apesar das questões éticas em relação ao uso de animais, este teste assume grande importância no contexto epidemiológico sanitário pela limitação dos métodos alternativos existentes e, portanto a falta de modelos que o substituam por completo.

Entretanto, as diferenças metodológicas e de critérios entre as principais Farmacopeias que preconizam o teste podem gerar incertezas em relação ao resultado, já que existe uma carência de estudos nesta área.

Além disso, deve ser considerado que estas diferenças podem ocasionar divergências nas avaliações dos protocolos de produção e controle de acordo com o país em que o produto foi fabricado. Os produtos de origem europeia, avaliados segundo protocolo Europeu, quando analisados por laboratórios nacionais, como o INCQS, seguem os critérios da Farmacopeia Brasileira conforme a legislação vigente. Desta forma, é de grande relevância que se avalie se estas diferenças metodológicas podem interferir nas interpretações e conclusões dos resultados.

Este trabalho também adquire grande importância para as ações de Vigilância Sanitária, pois pode subsidiar outros estudos e contribuir para uma proposta de harmonização dos critérios para a satisfatoriedade de produtos no teste de pirogênio *in vivo* de forma a garantir uma melhor qualidade e confiança de resultados.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Realizar uma análise comparativa dos resultados dos testes de pirogênio *in vivo* seguindo os métodos preconizados nas Farmacopeias Brasileira e Europeia, buscando identificar se estas diferenças podem interferir no resultado final das análises e avaliar criticamente de forma a definir qual é o critério mais seguro para o controle da qualidade dos produtos injetáveis.

3.2 - Objetivos específicos

- Realizar o levantamento das amostras analisadas no INCQS/DFT - setor de pirogênio com resultado de repetição e comparar os mesmos de acordo com os diferentes critérios das Farmacopeias Brasileira e Europeia;
- comparar os resultados de um ensaio hipotético utilizando o valor limite de febre de 0,5 °C para todos os animais de acordo com o método preconizado nas Farmacopeias Brasileira e Europeia;
- comparar os resultados de ensaios hipotéticos gerados a partir de uma planilha EXCEL[®] que incluam todas as possíveis situações relacionadas à primeira etapa do ensaio nas duas farmacopeias;
- avaliar a concordância e/ou discordância entre os resultados dependendo do critério utilizado.

4. METODOLOGIA

4.1 - Critérios da Farmacopeia Brasileira¹

No critério adotado pela Farmacopeia Brasileira para o produto ser considerado satisfatório no primeiro ensaio, os três animais devem apresentar a variação individual de temperatura inferior a 0,5°C em relação às suas respectivas temperaturas controle. Se pelo menos um dos três animais apresentarem variação individual de temperatura igual ou superior a 0,5°C o resultado é considerado duvidoso e deverá ser repetido um segundo ensaio com mais 5 (cinco) animais novos. O produto, depois do segundo ensaio, será considerado satisfatório se no máximo 3 (três) do total de 8 (oito) animais, (sendo três animais do primeiro ensaio mais cinco do segundo ensaio) apresentarem VIT igual ou superior a 0,5°C e se o somatório das variações individuais de temperatura desses 8 (oito) animais não for superior a 3,3°C. Caso contrário o produto é considerado insatisfatório (Quadro 2) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2010).

4.2 - Critérios da Farmacopeia Europeia¹

A Farmacopeia Europeia preconiza iniciar o ensaio com 3 animais. Caso o somatório da VIT seja inferior a 1,15°C, o produto será considerado apirogênico. Se este somatório for superior a 2,65°C, a amostra será considerada pirogênica. Estando o somatório dos 3 coelhos compreendido entre 1,15°C e 2,65°C, o teste deverá ser repetido com ou tros 3 animais. A avaliação segue conforme descrito no Quadro 2, podendo totalizar 12 animais (Quadro 2) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007 b).

¹ Para fins deste estudo uma amostra ou produto de classificação “ausência de pirogênio” (apirogênica) será também denominada pela expressão “satisfatória” e a amostra de classificação “presença de pirogênio” (pirogênica) receberá o sinônimo de “insatisfatória”. O resultado de “repetição” será também denominado “duvidoso”.

Quadro 2: Critérios de avaliação da contaminação pirogênica (método em coelhos) das Farmacopeias Brasileira e Europeia (Adaptado de TSCHUMI, 2003).

Nº Ensaio	Farmacopeia Brasileira			Farmacopeia Europeia		
	Nº total de Coelhos	Produto satisfatório se	Produto insatisfatório se Σ das VITs exceder	Nº total de Coelhos	Produto satisfatório se Σ das VITs não exceder	Produto insatisfatório se Σ das VITs exceder
1	3	Todos os coelhos VIT < 0,5°C	-----	3	1,15 °C	2,65°C
2	8 (5+3)	Até 3 animais possuir VIT \geq 0,5°C e Σ das VITs \leq 3,3°C	3,3°C	6 (3+3)	2,80 °C	4,30°C
3				9 (3+3+3)	4,45 °C	5,95°C
4				12(3+3+3+3)	6,60 °C	6,60°C

4.3 – Levantamento das amostras analisadas no Setor de Pirogênio do DFT/INCQS

Foram levantados os resultados duvidosos das análises da rotina do teste *in vivo*, no período de 2006 a 2010 pertencentes ao banco de dados do setor de pirogênio do DFT/INCQS, realizadas pelo método da Farmacopeia Brasileira. Os dados das variações de temperatura do primeiro ensaio (com 3 animais) foram mantidos para as duas Farmacopeias. Os dados do segundo teste (repetição com 5 animais) foram usados em sua totalidade para avaliar o resultado da Farmacopeia Brasileira e foram selecionadas as 3 variações menores e as 3 maiores para que fossem utilizadas como o segundo ensaio da Farmacopeia Europeia (com 3 animais). Verificou-se que não houve diferença de resultado para a seleção dos valores maiores e menores. Então para fins deste estudo foram utilizados os valores maiores. Cabe ressaltar que, em função de se ter somente 8 animais testados, não foram complementados os casos em que houve a necessidade do terceiro teste pela Farmacopeia Europeia, uma vez que seria preciso o total de 9 coelhos ou 12, no caso do quarto teste.

4.4 – Geração de dados hipotéticos

Foram testadas duas situações hipotéticas para avaliar se os critérios utilizados pelas Farmacopeias poderiam alterar o resultado final de um produto. Na primeira etapa utilizou-se o critério da VIT de 0,5 °C para todos os animais em todas as etapas previstas nas Farmacopeias Brasileira e Europeia. Na segunda etapa, os dados foram gerados em programa computacional, simulando diferentes resultados para um ensaio. Desta forma foi possível comparar os resultados satisfatórios ou insatisfatórios de uma suposta amostra em cada etapa.

4.4.1- VITs de 0,5°C em todas as etapas dos ensaios

Considerando que 0,5°C é a VIT que representa uma resposta febril pela Farmacopeia Brasileira, foi representada a hipótese de todos os animais apresentarem essa variação. Assim sendo, foi assumida uma situação onde os 3 animais do primeiro ensaio (válido para as duas Farmacopeias) apresentaram VITs de 0,5°C. Da mesma forma, essa variação foi assumida para a repetição com 5 animais da Farmacopeia Brasileira e para cada uma das outras 3 etapas da Farmacopeia Europeia.

4.4.2 – Dados gerados simulando as VITs do primeiro ensaio

As VITs foram geradas no aplicativo EXCEL[®] através de uma função Macro onde foram tabuladas todas as combinações numéricas de resultados do primeiro teste (3 animais) até o somatório de 3,3°C. Para fins deste estudo, este valor representa, o maior somatório possível de ausência de pirogênio totalizando 8 animais, segundo o critério da Farmacopeia Brasileira, uma vez que não está preconizada, em sua metodologia, a satisfatoriedade ou a insatisfatoriedade da amostra com o critério da soma das VITs dos 3 (três) animais no primeiro ensaio.

Como a Farmacopeia Brasileira não preconiza o critério de insatisfatoriedade da amostra com somatório das VITs dos três animais no primeiro ensaio, para fins deste trabalho o somatório de 3,3°C foi considerado como ponto de corte por ser o somatório que representa o critério de ausência de pirogênio totalizando os oito animais do segundo ensaio. Portanto, se os três coelhos do primeiro teste apresentarem o somatório das VITs > 3,3°C, no qual corresponde ao limite do critério do segundo ensaio, o teste termina nesta etapa com a insatisfatoriedade (presença de pirogênio) do produto.

Para efeito de comparação, foram selecionados os resultados onde as duas farmacopeias apresentam resultados concordantes/discordantes. Para tal, através do parâmetro lógico (E) no Aplicativo Excel[®], foi atribuído como “1” os dados onde as metodologias divergem e como “0” onde os dados convergem de acordo com cada metodologia estudada (Anexo I).

5 – RESULTADOS

5.1 – Avaliação dos critérios das Farmacopeias

A Farmacopeia Brasileira apresenta 2 (dois) critérios para avaliação de uma amostra: o número de animais apresentando VIT $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$ e o somatório dos 8 (oito) animais, que não deve exceder $3,3^{\circ}\text{C}$. No caso do primeiro ensaio, apenas o critério de um animal possuir VIT $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$ é suficiente para o resultado ser duvidoso e, portanto não se considera a existência de um somatório nesta etapa e que determine a reprovação direta do produto. Na realização do segundo ensaio considera-se não só o somatório acumulado como também o número de animais com VIT $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$ que não deve ser superior a três coelhos.

No caso de uma avaliação pela Farmacopeia Europeia é levado em consideração apenas como critério o somatório das VITs em cada etapa, não sendo considerada a variação de temperatura de cada animal no valor limite de VIT $\geq 0,5^{\circ}\text{C}$, aceito pela Farmacopeia Brasileira. Portanto, para fins comparativos, foram calculados os valores médios das VITs em cada ensaio, dividindo-se o valor do somatório mínimo para o resultado insatisfatório, pelo número total de animais. Nota-se que, em cada fase, os valores médios das VITs são diferentes, diminuindo à medida que aumenta o número de animais (Tabela 1).

Tabela 1: Critérios de insatisfatoriedade do produto segundo a metodologia da Farmacopeia Europeia para o somatório das VITs e a média das VITs por animal utilizado em cada ensaio.

Nº Ensaio	Nº Total de Coelhos	Produto insatisfatório, se Σ das VITs >	Média das VITs/coelho \geq
1	3	$2,65^{\circ}\text{C}$	$0,88^{\circ}\text{C}$
2	6	$4,30^{\circ}\text{C}$	$0,72^{\circ}\text{C}$
3	9	$5,95^{\circ}\text{C}$	$0,66^{\circ}\text{C}$
4	12	$6,60^{\circ}\text{C}$	$0,55^{\circ}\text{C}$

5.2 – Análise dos dados da rotina do setor de pirogênio

Entre os anos de 2006 a 2010, 44 amostras analisadas na rotina do setor de pirogênio apresentaram no primeiro teste com 3 animais, resultado indicativo de necessidade de repetição com novos animais, segundo método da Farmacopeia Brasileira. Deste total, 42 (95,5%) foram satisfatórias e duas (4,5%) foram consideradas insatisfatórias após o 2º ensaio (8 animais).

Quando estas 44 amostras foram analisadas tomando-se por base os critérios da Farmacopeia Europeia, apenas 1 (uma) amostra (2,2%) foi considerada insatisfatória, 29 (66%) foram satisfatórias e 14 (31,8%) apresentaram a necessidade de seguir para a segunda etapa. Destas amostras, 12 (85,7%) foram satisfatórias e 2 (14,3%) necessitariam seguir para o terceiro teste.

Dentre as amostras analisadas dois resultados podem ser destacados para exemplificar como a diferença de critério pode interferir na análise final dos produtos e no número de animais utilizados. Uma amostra de Parenteral de Grande Volume (Cloreto de Sódio) quando analisada pela Farmacopeia Brasileira apresentou resultado insatisfatório após o segundo ensaio. Caso este mesmo produto fosse realizado seguindo a metodologia da Farmacopeia Europeia a amostra seria insatisfatória já no primeiro ensaio (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise da amostra de Parenteral de Grande Volume segundo a metodologia das Farmacopeias Brasileira e Europeia.

Farmacopeia	1º Ensaio					2º Ensaio						
	VIT (°C)/Coelho		Σ	Resultado	VIT (°C)/Coelho				Σ	Resultado		
Brasileira	1,3	1	1	3,3	Repetir	1,1	1,3	1,1	1,3	0,9	9,1	Insatisf.
Europeia	1,3	1	1	3,3	Insatisf.							

Em outra situação, uma amostra de Hemoderivado (Albumina Humana 20%), também analisada pela Farmacopéia Brasileira, obteve resultado insatisfatório após o segundo ensaio enquanto que pelos critérios Europeus teria sido aprovada ainda no primeiro teste (Tabela 3). Portanto, a Farmacopeia Europeia apresenta resultado satisfatório em um produto que seria insatisfatório segundo os critérios da Farmacopeia Brasileira.

Tabela 3 - Análise da amostra de Hemoderivado segundo a metodologia das Farmacopeias Brasileira e Europeia.

Farmacopeia	1º Ensaio					2º Ensaio						
	VIT (°C)/Coelho		Σ	Resultado	VIT (°C)/Coelho		Σ	Resultado				
Brasileira	0,25	0,4	0,5	1,15	Repetir	0,25	0,6	0,7	0,5	1,0	4,2	Insatisfatório
Europeia	0,25	0,4	0,5	1,15	Satisfatório							

5.3 – Avaliação dos dados hipotéticos

5.3.1 - VITs dos ensaios iguais a 0,5°C

Quando foi representada a hipótese de todos os animais apresentarem as VITs iguais 0,5°C, verificou-se a necessidade de se r realizado um segundo ensaio nas duas farmacopéias.

Após o segundo ensaio, a Farmacopeia Brasileira apresentou resultado insatisfatório tanto pelo critério de número de animais com VIT $\geq 0,5^\circ\text{C}$ quanto pelo somatório dos 8 animais excedendo 3,3°C. Já na Farmacopeia Europeia esta mesma amostra ainda necessitaria de um terceiro ensaio após o resultado do segundo ensaio. Desta forma, o teste seria novamente repetido com mais 3 coelhos, totalizando 9 coelhos com somatório igual a 4,5°C seguindo até o

quarto e último ensaio com a utilização total de 12 coelhos e consequente satisfatoriedade final do produto (Figura 3).

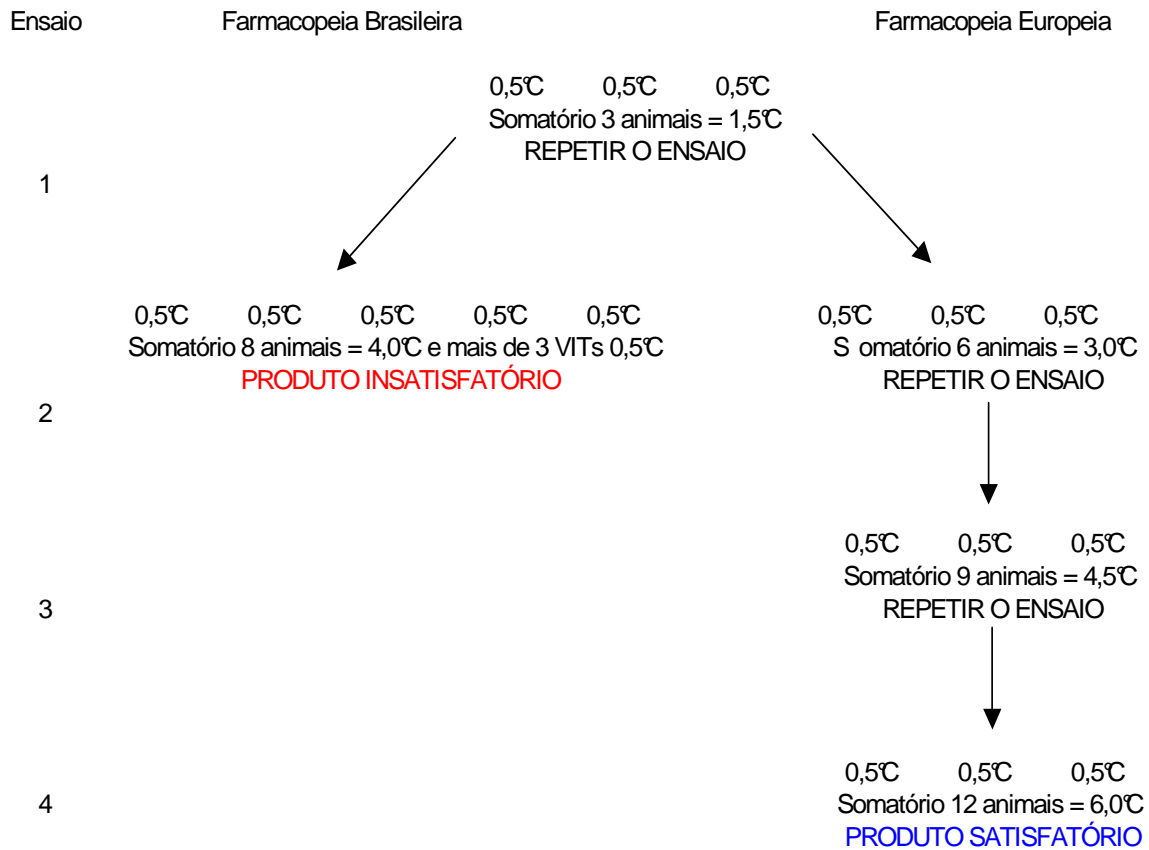


Figura 3: Representação hipotética onde todos os animais apresentariam VIT = 0,5°C, com avaliação segundo as Farmacopeias Brasileira e Europeia.

5.3.2 - VITs do primeiro ensaio geradas por simulação

Foram gerados o total de 451 combinações numéricas das Variações Individuais de Temperatura no aplicativo EXCEL[®] para o primeiro teste com três animais até o somatório de 3,3°C (Anexo 1).

Quando os dados foram analisados segundo a metodologia da Farmacopeia Brasileira, 35 (7,76%) foram satisfatórios, 416 (92,2%) foram repetidas em um segundo ensaio.

Tomando-se por base o critério da Farmacopeia Europeia, 83 (18,4%) dos dados foram classificados como satisfatórios, 319 (70,7%) passaram por um segundo ensaio e 49 (10,86 %) foram classificados como insatisfatórios.

Dos 416 dados do segundo ensaio, 99 (21,9%) possuem resultados divergentes e 352 (78,83%) concordantes entre as duas farmacopeias. Dos que apresentaram os mesmos resultados, 34 (7,54%) são satisfatórios, 318 (70,51%) foram repetidos em um segundo ensaio e nenhum resultado foi insatisfatório (Tabela 4).

Tabela 4: Dados gerados matematicamente do primeiro ensaio.

		Farmacopeia Europeia			Total
		Satisfatório	Repetir	Insatisfatório	
Farmacopeia Brasileira	Satisfatório	34 (7,54%)	1 (0,22%)	0	35
	Repetir	49 (10,86%)	318 (70,51%)	49 (10,86%)	416
	Insatisfatório	0	0	0	0
	Total	83	319	49	451

5.4 – Avaliação da concordância e/ou discordância entre os resultados dependendo do critério utilizado

Quando foram considerados os valores das VITs do primeiro ensaio gerados pelo EXCEL[®] foram observados alguns pontos divergentes entre as metodologias das duas farmacopeias. Desta forma, a frequência do somatório das VITs em relação aos dados gerados demonstrou que a Farmacopeia Brasileira em variações mais baixas (0,5^o C a 1,1^o C) repete ensaio, enquanto que a Europeia aprovaria-o direto. Por outro lado, em variações mais altas (2,7^o C a 3,3^o C), o resultado da amostra segundo a Farmacopeia Europeia seria insatisfatório ao passo que o mesmo seria repetido na Farmacopeia Brasileira (Figura 4).

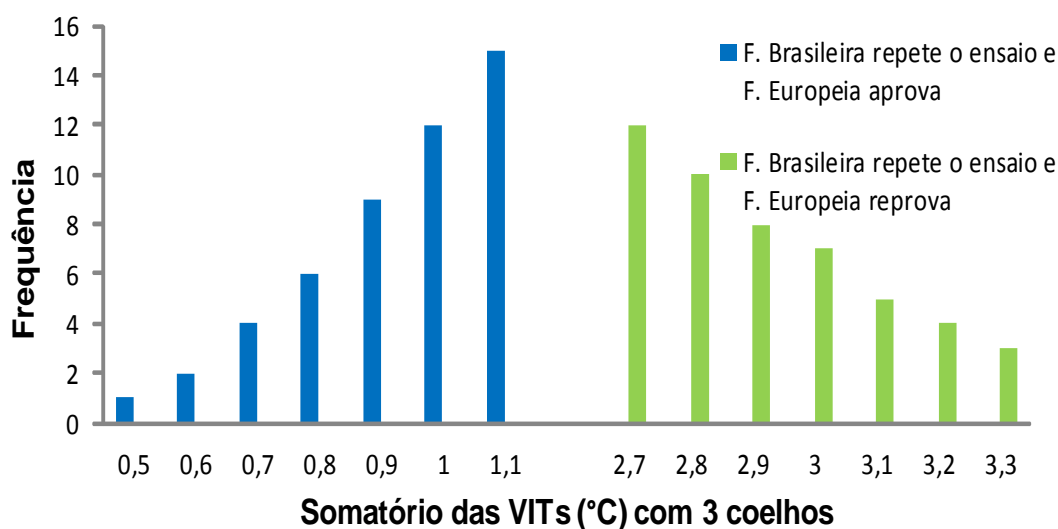


Figura 4: Frequência do somatório das VITs em relação aos dados gerados onde as farmacopeias diferem nos resultados de acordo com o primeiro teste.

Também foram encontrados alguns pontos onde os dados gerados convergem em relação a frequência do somatório das VITs de acordo com o primeiro teste. Nas faixas intermediárias (1,2^o C a 2,6^o C) tanto as metodologias da Farmacopeia Brasileira quanto da Farmacopeia Europeia levam à repetição, havendo a necessidade do segundo ensaio. Da mesma forma, as variações na

faixa entre 0,0°C a 1,1°C apontam que ambas as Farmacopeias apresentam resultado satisfatório no primeiro teste (Figura 5).

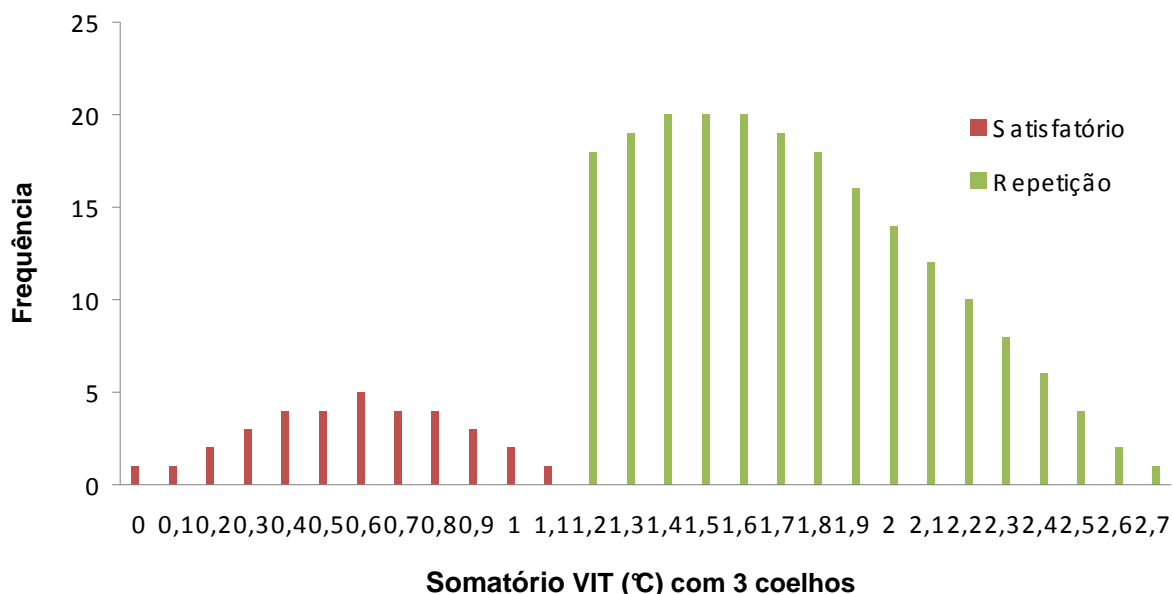


Figura 5: Frequência do somatório das VITs em relação aos dados gerados onde as farmacopeias possuem os mesmos resultados de acordo com o primeiro teste.

O mesmo resultado foi encontrado em relação ao primeiro teste de acordo com os dados da rotina do setor de pirogênio. A frequência das VITs demonstrou que na faixa de 0,5°C até 1,15°C as farmacopeias discordam nos resultados. A Farmacopeia Brasileira repete o produto, enquanto que a Europeia o aprova. Na faixa entre 1,2°C a 2,6°C ambas as farmacopeias repetem o ensaio. No ponto de 3,3°C (acima de 2,6°C) a Farmacopeia Europeia apresenta resultado insatisfatório enquanto que a Farmacopeia Brasileira apresenta resultado de repetição (Figura 6).

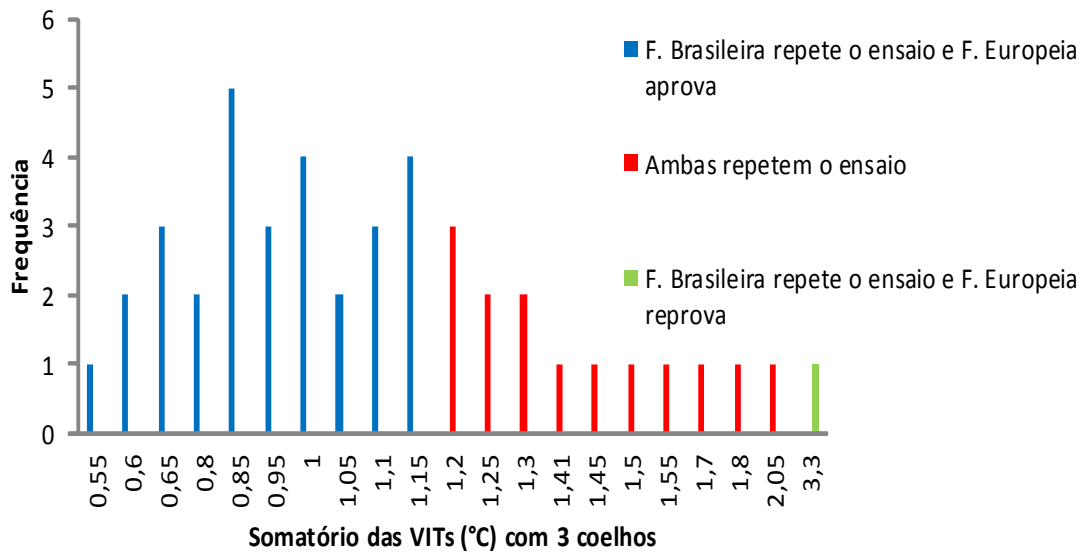


Figura 6: Frequência do somatório das VITs em relação às amostras da rotina do Setor de Pirogênio de acordo com o primeiro teste. Concordância e discordância de resultados.

6 – DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que existem diversas diferenças entre os métodos das duas Farmacopeias, que variam desde o número de animais utilizados até a conclusão quanto à pirogenicidade de uma amostra.

Até a terceira edição da Farmacopeia Brasileira, o valor do aumento individual de temperatura era 0,6°C, ou seja, caso pelo menos um dos 3 animais apresentasse essa variação, a amostra deveria ser repetida com 5 novos animais. Entretanto, havia um segundo parâmetro nessa primeira fase, que preconizava que se nenhum coelho apresentasse aumento igual ou superior a 0,6°C, o somatório dos 3 animais não poderia ser igual ou maior do que 1,4°C (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1976). Este segundo critério, na prática, significava que se 2 animais apresentassem variação igual a 0,5°C e um animal igual a 0,4°C, o teste deveria ser repetido com 5 novos animais. Cabe ressaltar que, para os 8 animais totais, o somatório máximo era 3,7°C, para que a amostra cumprisse com os quesitos de ausência de pirogênio.

Com a alteração da variação de febre de 0,6°C para 0,5°C, o segundo parâmetro foi retirado, por não fazer mais sentido. Conseqüentemente, o somatório foi reduzido para 3,3°C.

Comparando os dois métodos, é ressaltado o fato de que a Farmacopeia Europeia apresenta a possibilidade de resultado insatisfatório de uma amostra na primeira fase com 3 animais, o que não ocorre na Farmacopeia Brasileira (Tabela 2).

Um estudo publicado por Hoffmann e colaboradores (2005) sugere um novo critério para comprovar a presença de pirogênio no primeiro ensaio da Farmacopeia Americana, o mesmo da Brasileira. Desta forma, se os três coelhos do primeiro teste já apresentarem o somatório das VITs > 3,3°C, o produto seria considerado pirogênico, sem a necessidade de repetição com 5 novos animais, uma vez que o somatório com os 3 animais já superaria o permitido com 8

animais. Isto não só constitui ato de bom senso, como contribui sobremaneira para a redução no uso de animais.

Além da diferença de interpretação do método em relação ao primeiro ensaio, as farmacopeias também diferem no desenho experimental relacionando o número de ensaios e animais utilizados. A Farmacopeia Europeia possui até 4 etapas com a utilização máxima de 12 animais enquanto que a Farmacopeia Brasileira apresenta duas etapas com o número máximo de 8 coelhos por amostra. Portanto, se os dois métodos forem realizados até a última etapa, a metodologia Brasileira será executada em um período mais curto pelo menor número total de etapas, contribuindo para a agilidade de prazos na liberação de resultados. Assim sendo, até que o teste em coelhos seja substituído definitivamente, deve-se optar por um método que use o menor número possível de animais, mantendo o rigor de detecção necessário.

Uma diferença importante é o fato da Farmacopeia Europeia não considerar a elevação de 0,5°C como indicador de febre conforme demonstrado cientificamente por Hochstein e cols (1990). Como já mencionado, o método europeu considera apenas o somatório dos animais de cada fase e apresenta diferentes variações individuais médias em cada uma das etapas do teste, conforme mostrado na Tabela 1. Isso faz com que, para que uma amostra seja considerada insatisfatória já no primeiro teste é necessário que cada animal apresente um aumento de temperatura muito grande, o que corresponderia à uma concentração de endotoxina acima daquela necessária para produzir febre.

Esse fato foi demonstrado por Tschumi (2003) e Hoffmann e cols. (2005 b) que publicou um estudo definindo a concentração de endotoxina correspondente ao ponto de corte de variação individual de temperatura de um coelho. O ponto de corte é definido pelo valor total do somatório das VITs do último estágio dividido pelo número de animais. Para USP foi de 0,41°C (3,3°C/8) e a concentração de endotoxina foi de 2,53 UE/kg. Para a Farmacopeia Europeia o ponto de corte foi de 0,55°C (6,6°C/12) e a concentração de endotoxina correspondente foi de 5,22 UE/kg.

Os resultados dos dados gerados matematicamente no presente trabalho ratificam os dados analisados da rotina, nos quais permitem identificar que a Farmacopeia Brasileira é mais rigorosa quando o somatório das variações individuais de temperatura é baixo (até 1,15°C) e a Farmacopeia Europeia é mais rigorosa quando o somatório das VITs é alto (acima de 2,7°C). Na faixa intermediária (entre 1,2°C e 2,7°C) as farmacopeias apresentam comportamento congruente, ou seja, encaminham o produto para repetição.

Os resultados deste estudo, embora abrangendo apenas uma parte das possíveis combinações de aumentos de temperatura, indicam que as diferenças nas metodologias adotadas pelas Farmacopeia Brasileira e Europeia podem gerar incertezas nas avaliações dos protocolos dependendo do país em que este é analisado, levando a uma diferença de conclusões, quando da análise de amostras reais.

Do ponto de vista da segurança dos usuários um critério mais rigoroso para liberação dos produtos garante menor risco à saúde, visto que os produtos com limiares mais baixos de contaminação serão reprovados. Ao passo que na situação inversa, com um critério mais permissivo, pode-se incorrer no erro de considerar satisfatórios produtos com alguma concentração de contaminantes, apresentando risco à saúde dos usuários.

Um estudo mais aprofundado, com dados gerados por modelagem mimetizando todas as variações possíveis de temperatura para o segundo ensaio da Farmacopeia Brasileira se faz mister para, enfim, tornar possível uma proposta de harmonização de metodologia a ser empregada com a finalidade de promover a segurança dos produtos testados e a qualidade dos resultados.

7- CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que:

- 1- Existem diferenças entre as metodologias da Farmacopeia Brasileira e Europeia para avaliação dos resultados em pontos que podem levar a uma diferença de conclusões;
- 2- A Farmacopeia Europeia não considera o parâmetro de variação de temperatura de 0,5°C como resposta febril, portanto, não o adota como critério;
- 3- A Farmacopeia Brasileira é mais rígida em baixas VITs (de 0,0 °C a 1,15°C) enquanto que a Farmacopeia Europeia é mais rigorosa em altas VITs (acima de 2,7°C);
- 4- As diferenças existentes entre as Farmacopeias podem resultar em conclusões antagônicas e comprometer a segurança dos usuários.

REFERÊNCIAS

ABREU, D. M de. **Arte Boticária: Uma análise a partir de boticários e boticas da Comarca do Rio das Velhas na segunda metade do século XIX**. 2006. 162 p. Dissertação (Mestrado em História Social) - Faculdade de Filosofia e Ciências Humanas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/farmacopeia>>. Acesso em: 24 mar 2010.

BACHINSKI, R. et al. Criticism of the Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) test as a replacement method of the rabbit pyrogen test (RPT) and environmental health implications. In: 16th Congress on Alternatives to Animal Testing. **ALTEX - Alternatives in Experimentation**. Linz, 2010. v. 27. p. 15-15.

BALLS, M. **The three Rs and the humanity criterion**. An abridged version of The Principles of Humane Experimental Technique by W.M.S. Russel and R.L. Burch. FRAME, Nottingham, UK. 2009. 131p.

BOURG, V. et al. Estudio sobre la reutilización de los conejos utilizados para probar productos biológicos en el ensayo de pirógenos. Una alternativa para la reducción de animales. **Anais do I Taller de Ensayos Biológicos**, BioCen, La Habana, Cuba, 1997.

BRASIL. Portaria SVS n. 109, de 4 de novembro de 1993. Delega ao INCAS a responsabilidade sobre a emissão de parecer técnico sobre solicitação de registro e de programar as inspeções sobre Boas Práticas de Fabricação. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 08 nov. 1993, p. 16.723, 1993.

CALDEIRA, C.; GIMENES, I. C.; FREITAS, J. C. B. R.; PRESGRAVE, O. A. F. The use of Mono Mac 6 cells as indicators of endotoxin contamination in the quality control of injectable products. **ALTEX**; 2005. v. 22 (Special Issue). p.213.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Monocyte - Activation Test. In: **EUROPEAN Pharmacopoeia**. 6 th Edition, suppl. 6.7. Strasbourg: Concil of Europe, 2009 a. p.5440-5445.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Bacterial Endotoxins Test. In: **EUROPEAN Pharmacopoeia**. 6.6 Edition. Strasbourg: Concil of Europe, 2009 b. p.5077-5081.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Introduction. In: **EUROPEAN Pharmacopoeia**. 3 Edition. Strasbourg: Concil of Europe, 1997. p.iii – v.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Preface. In: **EUROPEAN Pharmacopoeia**. 6. th Edition. Strasbourg: Concil of Europe, 2007 a. v.1, p.i-iii.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Preface. In: **EUROPEAN Pharmacopoeia**. Maisonneuve S.A: Sainte-Ruffine, France,1969. p.9 - 19.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Pyrogens. In: **EUROPEAN Pharmacopoeia**. 6. th Edition. Strasbourg: Concil of Europe, 2007 b. v.1, p. 164-165.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Test for pyrogens. In: **EUROPEAN Pharmacopoeia**. Maisonneuve S.A: Sainte-Ruffine, France,1971. Vol.2. p.58 - 60.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Histórico. In: **FARMACOPÉIA Brasileira**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt1. p.II 1-2.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Pirogênios. In: **FARMACOPÉIA Brasileira**. 3 ed. São Paulo: Organização Andrei Editoras S.A, 1976. p. 993-994.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Pirogênios. In: **FARMACOPÉIA Brasileira**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. pt2. Fasc.5. p. V5.1.2-1-2.

FREITAS, J. C. B. R. **A reutilização de coelhos submetidos ao teste de pirogênio com produtos biológicos sujeitos à vigilância sanitária.** 2008. 60p. Dissertação (Mestrado) – INCQS/FIOCRUZ. Rio de Janeiro. Brasil.

HARTUNG, T et. al. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction. **Atla**; v. 29: p 99-123. 2001.

HOCHSTEIN, H. D; MUNSON, T. E; OUTSCHOORN, A. S. Comparison of rabbit responses of two *E. coli* endotoxin preparations in the USP rabbit pyrogen test. **Pharmacopeial Forum**; Mar-Apr: 346-351. 1990.

HOFFMANN, S. et al. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. **J Immunol Methods**; 298 (1-2):161-73, 2005 a.

HOFFMANN, S; LÜDERITZ-PÜCHEL, U; MONTAG, T; HARTUNG, T. Optimization of testing in parenterals according to different pharmacopoeias by probabilistic modeling. **Journal of Endotoxin Research**; v.11: p.25 – 31, 2005 b.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE. **Atividades institucionais 2005-2008.** Rio de Janeiro, 2009. 107p.

MELANDRI, V; FARIA, G; CALDEIRA, C; PRESGRAVE, O. Utilização de métodos alternativos na determinação da contaminação pirogênica no controle de produtos injetáveis sujeitos à Vigilância Sanitária. 2010. **Universitas.** No prelo. Ciências da Saúde (UNICEUB).

NOGUEIRA, S. T.B. **A reutilização de coelhos submetidos ao teste de pirogênio no controle da qualidade de produtos biológicos com enfoque na vacina antimeningocócica AC.** 2009. 30p. Monografia (Especialização) - INCQS/FIOCRUZ. Rio de Janeiro. Brasil.

PEARSON, F.C. **Pyrogens: endotoxins, LAL testing and depyrogenation.** New York: Marcel Dekk, pag 3 - 73.1985.

PRESGRAVE, O. A. F. **Teste de liberação de citocinas como método alternativo ao ensaio de pirogênio em coelhos no controle da qualidade de produtos injetáveis.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Fiocruz, Rio de Janeiro.

PRESGRAVE, O. A. F. et al. 2005. The use of cytsatisfatórioine release (whole blood assay) for detecting pyrogens in anti-venom sera. **ALTEX**; 22 (Special Issue): 221.

SCHINDLER, S; VON AULOCK, S; DANESHIAN, M; HARTUNG, T. Development, Validation and Applications of the Monocyte Activation Test for Pyrogens Based on Human Whole Blood. **ALTEX** , v.26. p. 4-9. 2009.

SILVA, A. C. P da. O Laboratório Oficial na avaliação analítica. In: ROZENFELD, S.(org). **Fundamentos da vigilância sanitária.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000. p. 271-301.

TSCHUMI, J. Comparison of temperature rise interpretations between European and United States Pharmacopeias Pyrogen Tests. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology.** Vol. 57, n.3. May-June 2003. 218-227.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. In: **USP 33/NF 28:** reissue. Rockville, 2010. CD-ROM.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. Mission and Preface. In: **USP 32/NF 27;** Rockville, 2009 a. p.v-x.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. Pyrogen test. In: **USP 32/NF 27:** Rockville, 2009 b. p.124-125.

WILLIAMS, L. K. **Endotoxins. Pirogens, LAL Testing and Depyrogenation.** 2^a ed. New York: Marcel Dekker, 2007. 372 p.

APÊNDICE I – Dados brutos referente aos valores gerados por modelagem.

Coelho 1	Coelho 2	Coelho 3	Soma dos 3 coelhos	F. Brasileira	F. Europeia	Comparação
0	0	0	0	satisfatório	satisfatório	0
0	0	0,1	0,1	satisfatório	satisfatório	0
0	0	0,2	0,2	satisfatório	satisfatório	0
0	0	0,3	0,3	satisfatório	satisfatório	0
0	0	0,4	0,4	satisfatório	satisfatório	0
0	0	0,5	0,5	repetir	satisfatório	1
0	0	0,6	0,6	repetir	satisfatório	1
0	0	0,7	0,7	repetir	satisfatório	1
0	0	0,8	0,8	repetir	satisfatório	1
0	0	0,9	0,9	repetir	satisfatório	1
0	0	1	1	repetir	satisfatório	1
0	0	1,1	1,1	repetir	satisfatório	1
0	0	1,2	1,2	repetir	repetir	0
0	0,1	0,1	0,2	satisfatório	satisfatório	0
0	0,1	0,2	0,3	satisfatório	satisfatório	0
0	0,1	0,3	0,4	satisfatório	satisfatório	0
0	0,1	0,4	0,5	satisfatório	satisfatório	0
0	0,1	0,5	0,6	repetir	satisfatório	1
0	0,1	0,6	0,7	repetir	satisfatório	1
0	0,1	0,7	0,8	repetir	satisfatório	1
0	0,1	0,8	0,9	repetir	satisfatório	1
0	0,1	0,9	1	repetir	satisfatório	1
0	0,1	1	1,1	repetir	satisfatório	1
0	0,1	1,1	1,2	repetir	repetir	0
0	0,1	1,2	1,3	repetir	repetir	0
0	0,2	0,2	0,4	satisfatório	satisfatório	0
0	0,2	0,3	0,5	satisfatório	satisfatório	0
0	0,2	0,4	0,6	satisfatório	satisfatório	0
0	0,2	0,5	0,7	repetir	satisfatório	1
0	0,2	0,6	0,8	repetir	satisfatório	1
0	0,2	0,7	0,9	repetir	satisfatório	1
0	0,2	0,8	1	repetir	satisfatório	1
0	0,2	0,9	1,1	repetir	satisfatório	1
0	0,2	1	1,2	repetir	repetir	0
0	0,2	1,1	1,3	repetir	repetir	0
0	0,2	1,2	1,4	repetir	repetir	0
0	0,3	0,3	0,6	satisfatório	satisfatório	0
0	0,3	0,4	0,7	satisfatório	satisfatório	0
0	0,3	0,5	0,8	repetir	satisfatório	1
0	0,3	0,6	0,9	repetir	satisfatório	1
0	0,3	0,7	1	repetir	satisfatório	1
0	0,3	0,8	1,1	repetir	satisfatório	1
0	0,3	0,9	1,2	repetir	repetir	0
0	0,3	1	1,3	repetir	repetir	0
0	0,3	1,1	1,4	repetir	repetir	0
0	0,3	1,2	1,5	repetir	repetir	0

Coelho 1	Coelho 2	Coelho 3	Soma dos 3 coelhos	F. Brasileira	F. Europeia	Comparação
0	0,4	0,4	0,8	satisfatório	satisfatório	0
0	0,4	0,5	0,9	repetir	satisfatório	1
0	0,4	0,6	1	repetir	satisfatório	1
0	0,4	0,7	1,1	repetir	satisfatório	1
0	0,4	0,8	1,2	repetir	repetir	0
0	0,4	0,9	1,3	repetir	repetir	0
0	0,4	1	1,4	repetir	repetir	0
0	0,4	1,1	1,5	repetir	repetir	0
0	0,4	1,2	1,6	repetir	repetir	0
0	0,5	0,5	1	repetir	satisfatório	1
0	0,5	0,6	1,1	repetir	satisfatório	1
0	0,5	0,7	1,2	repetir	repetir	0
0	0,5	0,8	1,3	repetir	repetir	0
0	0,5	0,9	1,4	repetir	repetir	0
0	0,5	1	1,5	repetir	repetir	0
0	0,5	1,1	1,6	repetir	repetir	0
0	0,5	1,2	1,7	repetir	repetir	0
0	0,6	0,6	1,2	repetir	repetir	0
0	0,6	0,7	1,3	repetir	repetir	0
0	0,6	0,8	1,4	repetir	repetir	0
0	0,6	0,9	1,5	repetir	repetir	0
0	0,6	1	1,6	repetir	repetir	0
0	0,6	1,1	1,7	repetir	repetir	0
0	0,6	1,2	1,8	repetir	repetir	0
0	0,7	0,7	1,4	repetir	repetir	0
0	0,7	0,8	1,5	repetir	repetir	0
0	0,7	0,9	1,6	repetir	repetir	0
0	0,7	1	1,7	repetir	repetir	0
0	0,7	1,1	1,8	repetir	repetir	0
0	0,7	1,2	1,9	repetir	repetir	0
0	0,8	0,8	1,6	repetir	repetir	0
0	0,8	0,9	1,7	repetir	repetir	0
0	0,8	1	1,8	repetir	repetir	0
0	0,8	1,1	1,9	repetir	repetir	0
0	0,8	1,2	2	repetir	repetir	0
0	0,9	0,9	1,8	repetir	repetir	0
0	0,9	1	1,9	repetir	repetir	0
0	0,9	1,1	2	repetir	repetir	0
0	0,9	1,2	2,1	repetir	repetir	0
0	1	1	2	repetir	repetir	0
0	1	1,1	2,1	repetir	repetir	0
0	1	1,2	2,2	repetir	repetir	0
0	1,1	1,1	2,2	repetir	repetir	0
0	1,1	1,2	2,3	repetir	repetir	0
0	1,2	1,2	2,4	repetir	repetir	0
0,1	0,1	0,1	0,3	satisfatório	satisfatório	0
0,1	0,1	0,2	0,4	satisfatório	satisfatório	0
0,1	0,1	0,3	0,5	satisfatório	satisfatório	0
0,1	0,1	0,4	0,6	satisfatório	satisfatório	0
0,1	0,1	0,5	0,7	repetir	satisfatório	1

Coelho 1	Coelho 2	Coelho 3	Soma dos 3 coelhos	F. Brasileira	F. Europeia	Comparação
0,1	0,1	0,6	0,8	repetir	satisfatório	1
0,1	0,1	0,7	0,9	repetir	satisfatório	1
0,1	0,1	0,8	1	repetir	satisfatório	1
0,1	0,1	0,9	1,1	repetir	satisfatório	1
0,1	0,1	1	1,2	repetir	repetir	0
0,1	0,1	1,1	1,3	repetir	repetir	0
0,1	0,1	1,2	1,4	repetir	repetir	0
0,1	0,2	0,2	0,5	satisfatório	satisfatório	0
0,1	0,2	0,3	0,6	satisfatório	satisfatório	0
0,1	0,2	0,4	0,7	satisfatório	satisfatório	0
0,1	0,2	0,5	0,8	repetir	satisfatório	1
0,1	0,2	0,6	0,9	repetir	satisfatório	1
0,1	0,2	0,7	1	repetir	satisfatório	1
0,1	0,2	0,8	1,1	repetir	satisfatório	1
0,1	0,2	0,9	1,2	repetir	repetir	0
0,1	0,2	1	1,3	repetir	repetir	0
0,1	0,2	1,1	1,4	repetir	repetir	0
0,1	0,2	1,2	1,5	repetir	repetir	0
0,1	0,3	0,3	0,7	satisfatório	satisfatório	0
0,1	0,3	0,4	0,8	satisfatório	satisfatório	0
0,1	0,3	0,5	0,9	repetir	satisfatório	1
0,1	0,3	0,6	1	repetir	satisfatório	1
0,1	0,3	0,7	1,1	repetir	satisfatório	1
0,1	0,3	0,8	1,2	repetir	repetir	0
0,1	0,3	0,9	1,3	repetir	repetir	0
0,1	0,3	1	1,4	repetir	repetir	0
0,1	0,3	1,1	1,5	repetir	repetir	0
0,1	0,3	1,2	1,6	repetir	repetir	0
0,1	0,4	0,4	0,9	satisfatório	satisfatório	0
0,1	0,4	0,5	1	repetir	satisfatório	1
0,1	0,4	0,6	1,1	repetir	satisfatório	1
0,1	0,4	0,7	1,2	repetir	repetir	0
0,1	0,4	0,8	1,3	repetir	repetir	0
0,1	0,4	0,9	1,4	repetir	repetir	0
0,1	0,4	1	1,5	repetir	repetir	0
0,1	0,4	1,1	1,6	repetir	repetir	0
0,1	0,4	1,2	1,7	repetir	repetir	0
0,1	0,5	0,5	1,1	repetir	satisfatório	1
0,1	0,5	0,6	1,2	repetir	repetir	0
0,1	0,5	0,7	1,3	repetir	repetir	0
0,1	0,5	0,8	1,4	repetir	repetir	0
0,1	0,5	0,9	1,5	repetir	repetir	0
0,1	0,5	1	1,6	repetir	repetir	0
0,1	0,5	1,1	1,7	repetir	repetir	0
0,1	0,5	1,2	1,8	repetir	repetir	0
0,1	0,6	0,6	1,3	repetir	repetir	0
0,1	0,6	0,7	1,4	repetir	repetir	0
0,1	0,6	0,8	1,5	repetir	repetir	0
0,1	0,6	0,9	1,6	repetir	repetir	0
0,1	0,6	1	1,7	repetir	repetir	0

Coelho 1	Coelho 2	Coelho 3	Soma dos 3 coelhos	F. Brasileira	F. Europeia	Comparação
0,1	0,6	1,1	1,8	repetir	repetir	0
0,1	0,6	1,2	1,9	repetir	repetir	0
0,1	0,7	0,7	1,5	repetir	repetir	0
0,1	0,7	0,8	1,6	repetir	repetir	0
0,1	0,7	0,9	1,7	repetir	repetir	0
0,1	0,7	1	1,8	repetir	repetir	0
0,1	0,7	1,1	1,9	repetir	repetir	0
0,1	0,7	1,2	2	repetir	repetir	0
0,1	0,8	0,8	1,7	repetir	repetir	0
0,1	0,8	0,9	1,8	repetir	repetir	0
0,1	0,8	1	1,9	repetir	repetir	0
0,1	0,8	1,1	2	repetir	repetir	0
0,1	0,8	1,2	2,1	repetir	repetir	0
0,1	0,9	0,9	1,9	repetir	repetir	0
0,1	0,9	1	2	repetir	repetir	0
0,1	0,9	1,1	2,1	repetir	repetir	0
0,1	0,9	1,2	2,2	repetir	repetir	0
0,1	1	1	2,1	repetir	repetir	0
0,1	1	1,1	2,2	repetir	repetir	0
0,1	1	1,2	2,3	repetir	repetir	0
0,1	1,1	1,1	2,3	repetir	repetir	0
0,1	1,1	1,2	2,4	repetir	repetir	0
0,1	1,2	1,2	2,5	repetir	repetir	0
0,2	0,2	0,2	0,6	satisfatório	satisfatório	0
0,2	0,2	0,3	0,7	satisfatório	satisfatório	0
0,2	0,2	0,4	0,8	satisfatório	satisfatório	0
0,2	0,2	0,5	0,9	repetir	satisfatório	1
0,2	0,2	0,6	1	repetir	satisfatório	1
0,2	0,2	0,7	1,1	repetir	satisfatório	1
0,2	0,2	0,8	1,2	repetir	repetir	0
0,2	0,2	0,9	1,3	repetir	repetir	0
0,2	0,2	1	1,4	repetir	repetir	0
0,2	0,2	1,1	1,5	repetir	repetir	0
0,2	0,2	1,2	1,6	repetir	repetir	0
0,2	0,3	0,3	0,8	satisfatório	satisfatório	0
0,2	0,3	0,4	0,9	satisfatório	satisfatório	0
0,2	0,3	0,5	1	repetir	satisfatório	1
0,2	0,3	0,6	1,1	repetir	satisfatório	1
0,2	0,3	0,7	1,2	repetir	repetir	0
0,2	0,3	0,8	1,3	repetir	repetir	0
0,2	0,3	0,9	1,4	repetir	repetir	0
0,2	0,3	1	1,5	repetir	repetir	0
0,2	0,3	1,1	1,6	repetir	repetir	0
0,2	0,3	1,2	1,7	repetir	repetir	0
0,2	0,4	0,4	1	satisfatório	satisfatório	0
0,2	0,4	0,5	1,1	repetir	satisfatório	1
0,2	0,4	0,6	1,2	repetir	repetir	0
0,2	0,4	0,7	1,3	repetir	repetir	0
0,2	0,4	0,8	1,4	repetir	repetir	0
0,2	0,4	0,9	1,5	repetir	repetir	0

Coelho 1	Coelho 2	Coelho 3	Soma dos 3 coelhos	F. Brasileira	F. Europeia	Comparação
0,2	0,4	1	1,6	repetir	repetir	0
0,2	0,4	1,1	1,7	repetir	repetir	0
0,2	0,4	1,2	1,8	repetir	repetir	0
0,2	0,5	0,5	1,2	repetir	repetir	0
0,2	0,5	0,6	1,3	repetir	repetir	0
0,2	0,5	0,7	1,4	repetir	repetir	0
0,2	0,5	0,8	1,5	repetir	repetir	0
0,2	0,5	0,9	1,6	repetir	repetir	0
0,2	0,5	1	1,7	repetir	repetir	0
0,2	0,5	1,1	1,8	repetir	repetir	0
0,2	0,5	1,2	1,9	repetir	repetir	0
0,2	0,6	0,6	1,4	repetir	repetir	0
0,2	0,6	0,7	1,5	repetir	repetir	0
0,2	0,6	0,8	1,6	repetir	repetir	0
0,2	0,6	0,9	1,7	repetir	repetir	0
0,2	0,6	1	1,8	repetir	repetir	0
0,2	0,6	1,1	1,9	repetir	repetir	0
0,2	0,6	1,2	2	repetir	repetir	0
0,2	0,7	0,7	1,6	repetir	repetir	0
0,2	0,7	0,8	1,7	repetir	repetir	0
0,2	0,7	0,9	1,8	repetir	repetir	0
0,2	0,7	1	1,9	repetir	repetir	0
0,2	0,7	1,1	2	repetir	repetir	0
0,2	0,7	1,2	2,1	repetir	repetir	0
0,2	0,8	0,8	1,8	repetir	repetir	0
0,2	0,8	0,9	1,9	repetir	repetir	0
0,2	0,8	1	2	repetir	repetir	0
0,2	0,8	1,1	2,1	repetir	repetir	0
0,2	0,8	1,2	2,2	repetir	repetir	0
0,2	0,9	0,9	2	repetir	repetir	0
0,2	0,9	1	2,1	repetir	repetir	0
0,2	0,9	1,1	2,2	repetir	repetir	0
0,2	0,9	1,2	2,3	repetir	repetir	0
0,2	1	1	2,2	repetir	repetir	0
0,2	1	1,1	2,3	repetir	repetir	0
0,2	1	1,2	2,4	repetir	repetir	0
0,2	1,1	1,1	2,4	repetir	repetir	0
0,2	1,1	1,2	2,5	repetir	repetir	0
0,2	1,2	1,2	2,6	repetir	repetir	0
0,3	0,3	0,3	0,9	satisfatório	satisfatório	0
0,3	0,3	0,4	1	satisfatório	satisfatório	0
0,3	0,3	0,5	1,1	repetir	satisfatório	1
0,3	0,3	0,6	1,2	repetir	repetir	0
0,3	0,3	0,7	1,3	repetir	repetir	0
0,3	0,3	0,8	1,4	repetir	repetir	0
0,3	0,3	0,9	1,5	repetir	repetir	0
0,3	0,3	1	1,6	repetir	repetir	0
0,3	0,3	1,1	1,7	repetir	repetir	0
0,3	0,3	1,2	1,8	repetir	repetir	0
0,3	0,4	0,4	1,1	satisfatório	satisfatório	0

Coelho 1	Coelho 2	Coelho 3	Soma dos 3 coelhos	F. Brasileira	F. Europeia	Comparação
0,3	0,4	0,5	1,2	repetir	repetir	0
0,3	0,4	0,6	1,3	repetir	repetir	0
0,3	0,4	0,7	1,4	repetir	repetir	0
0,3	0,4	0,8	1,5	repetir	repetir	0
0,3	0,4	0,9	1,6	repetir	repetir	0
0,3	0,4	1	1,7	repetir	repetir	0
0,3	0,4	1,1	1,8	repetir	repetir	0
0,3	0,4	1,2	1,9	repetir	repetir	0
0,3	0,5	0,5	1,3	repetir	repetir	0
0,3	0,5	0,6	1,4	repetir	repetir	0
0,3	0,5	0,7	1,5	repetir	repetir	0
0,3	0,5	0,8	1,6	repetir	repetir	0
0,3	0,5	0,9	1,7	repetir	repetir	0
0,3	0,5	1	1,8	repetir	repetir	0
0,3	0,5	1,1	1,9	repetir	repetir	0
0,3	0,5	1,2	2	repetir	repetir	0
0,3	0,6	0,6	1,5	repetir	repetir	0
0,3	0,6	0,7	1,6	repetir	repetir	0
0,3	0,6	0,8	1,7	repetir	repetir	0
0,3	0,6	0,9	1,8	repetir	repetir	0
0,3	0,6	1	1,9	repetir	repetir	0
0,3	0,6	1,1	2	repetir	repetir	0
0,3	0,6	1,2	2,1	repetir	repetir	0
0,3	0,7	0,7	1,7	repetir	repetir	0
0,3	0,7	0,8	1,8	repetir	repetir	0
0,3	0,7	0,9	1,9	repetir	repetir	0
0,3	0,7	1	2	repetir	repetir	0
0,3	0,7	1,1	2,1	repetir	repetir	0
0,3	0,7	1,2	2,2	repetir	repetir	0
0,3	0,8	0,8	1,9	repetir	repetir	0
0,3	0,8	0,9	2	repetir	repetir	0
0,3	0,8	1	2,1	repetir	repetir	0
0,3	0,8	1,1	2,2	repetir	repetir	0
0,3	0,8	1,2	2,3	repetir	repetir	0
0,3	0,9	0,9	2,1	repetir	repetir	0
0,3	0,9	1	2,2	repetir	repetir	0
0,3	0,9	1,1	2,3	repetir	repetir	0
0,3	0,9	1,2	2,4	repetir	repetir	0
0,3	1	1	2,3	repetir	repetir	0
0,3	1	1,1	2,4	repetir	repetir	0
0,3	1	1,2	2,5	repetir	repetir	0
0,3	1,1	1,1	2,5	repetir	repetir	0
0,3	1,1	1,2	2,6	repetir	repetir	0
0,3	1,2	1,2	2,7	repetir	insatisfatório	1
0,4	0,4	0,4	1,2	satisfatório	repetir	1
0,4	0,4	0,5	1,3	repetir	repetir	0
0,4	0,4	0,6	1,4	repetir	repetir	0
0,4	0,4	0,7	1,5	repetir	repetir	0
0,4	0,4	0,8	1,6	repetir	repetir	0
0,4	0,4	0,9	1,7	repetir	repetir	0

Coelho 1	Coelho 2	Coelho 3	Soma dos 3 coelhos	F. Brasileira	F. Europeia	Comparação
0,4	0,4	1	1,8	repetir	repetir	0
0,4	0,4	1,1	1,9	repetir	repetir	0
0,4	0,4	1,2	2	repetir	repetir	0
0,4	0,5	0,5	1,4	repetir	repetir	0
0,4	0,5	0,6	1,5	repetir	repetir	0
0,4	0,5	0,7	1,6	repetir	repetir	0
0,4	0,5	0,8	1,7	repetir	repetir	0
0,4	0,5	0,9	1,8	repetir	repetir	0
0,4	0,5	1	1,9	repetir	repetir	0
0,4	0,5	1,1	2	repetir	repetir	0
0,4	0,5	1,2	2,1	repetir	repetir	0
0,4	0,6	0,6	1,6	repetir	repetir	0
0,4	0,6	0,7	1,7	repetir	repetir	0
0,4	0,6	0,8	1,8	repetir	repetir	0
0,4	0,6	0,9	1,9	repetir	repetir	0
0,4	0,6	1	2	repetir	repetir	0
0,4	0,6	1,1	2,1	repetir	repetir	0
0,4	0,6	1,2	2,2	repetir	repetir	0
0,4	0,7	0,7	1,8	repetir	repetir	0
0,4	0,7	0,8	1,9	repetir	repetir	0
0,4	0,7	0,9	2	repetir	repetir	0
0,4	0,7	1	2,1	repetir	repetir	0
0,4	0,7	1,1	2,2	repetir	repetir	0
0,4	0,7	1,2	2,3	repetir	repetir	0
0,4	0,8	0,8	2	repetir	repetir	0
0,4	0,8	0,9	2,1	repetir	repetir	0
0,4	0,8	1	2,2	repetir	repetir	0
0,4	0,8	1,1	2,3	repetir	repetir	0
0,4	0,8	1,2	2,4	repetir	repetir	0
0,4	0,9	0,9	2,2	repetir	repetir	0
0,4	0,9	1	2,3	repetir	repetir	0
0,4	0,9	1,1	2,4	repetir	repetir	0
0,4	0,9	1,2	2,5	repetir	repetir	0
0,4	1	1	2,4	repetir	repetir	0
0,4	1	1,1	2,5	repetir	repetir	0
0,4	1	1,2	2,6	repetir	repetir	0
0,4	1,1	1,1	2,6	repetir	repetir	0
0,4	1,1	1,2	2,7	repetir	insatisfatório	1
0,4	1,2	1,2	2,8	repetir	insatisfatório	1
0,5	0,5	0,5	1,5	repetir	repetir	0
0,5	0,5	0,6	1,6	repetir	repetir	0
0,5	0,5	0,7	1,7	repetir	repetir	0
0,5	0,5	0,8	1,8	repetir	repetir	0
0,5	0,5	0,9	1,9	repetir	repetir	0
0,5	0,5	1	2	repetir	repetir	0
0,5	0,5	1,1	2,1	repetir	repetir	0
0,5	0,5	1,2	2,2	repetir	repetir	0
0,5	0,6	0,6	1,7	repetir	repetir	0
0,5	0,6	0,7	1,8	repetir	repetir	0
0,5	0,6	0,8	1,9	repetir	repetir	0

Coelho 1	Coelho 2	Coelho 3	Soma dos 3 coelhos	F. Brasileira	F. Europeia	Comparação
0,5	0,6	0,9	2	repetir	repetir	0
0,5	0,6	1	2,1	repetir	repetir	0
0,5	0,6	1,1	2,2	repetir	repetir	0
0,5	0,6	1,2	2,3	repetir	repetir	0
0,5	0,7	0,7	1,9	repetir	repetir	0
0,5	0,7	0,8	2	repetir	repetir	0
0,5	0,7	0,9	2,1	repetir	repetir	0
0,5	0,7	1	2,2	repetir	repetir	0
0,5	0,7	1,1	2,3	repetir	repetir	0
0,5	0,7	1,2	2,4	repetir	repetir	0
0,5	0,8	0,8	2,1	repetir	repetir	0
0,5	0,8	0,9	2,2	repetir	repetir	0
0,5	0,8	1	2,3	repetir	repetir	0
0,5	0,8	1,1	2,4	repetir	repetir	0
0,5	0,8	1,2	2,5	repetir	repetir	0
0,5	0,9	0,9	2,3	repetir	repetir	0
0,5	0,9	1	2,4	repetir	repetir	0
0,5	0,9	1,1	2,5	repetir	repetir	0
0,5	0,9	1,2	2,6	repetir	repetir	0
0,5	1	1	2,5	repetir	repetir	0
0,5	1	1,1	2,6	repetir	repetir	0
0,5	1	1,2	2,7	repetir	insatisfatório	1
0,5	1,1	1,1	2,7	repetir	insatisfatório	1
0,5	1,1	1,2	2,8	repetir	insatisfatório	1
0,5	1,2	1,2	2,9	repetir	insatisfatório	1
0,6	0,6	0,6	1,8	repetir	repetir	0
0,6	0,6	0,7	1,9	repetir	repetir	0
0,6	0,6	0,8	2	repetir	repetir	0
0,6	0,6	0,9	2,1	repetir	repetir	0
0,6	0,6	1	2,2	repetir	repetir	0
0,6	0,6	1,1	2,3	repetir	repetir	0
0,6	0,6	1,2	2,4	repetir	repetir	0
0,6	0,7	0,7	2	repetir	repetir	0
0,6	0,7	0,8	2,1	repetir	repetir	0
0,6	0,7	0,9	2,2	repetir	repetir	0
0,6	0,7	1	2,3	repetir	repetir	0
0,6	0,7	1,1	2,4	repetir	repetir	0
0,6	0,7	1,2	2,5	repetir	repetir	0
0,6	0,8	0,8	2,2	repetir	repetir	0
0,6	0,8	0,9	2,3	repetir	repetir	0
0,6	0,8	1	2,4	repetir	repetir	0
0,6	0,8	1,1	2,5	repetir	repetir	0
0,6	0,8	1,2	2,6	repetir	repetir	0
0,6	0,9	0,9	2,4	repetir	repetir	0
0,6	0,9	1	2,5	repetir	repetir	0
0,6	0,9	1,1	2,6	repetir	repetir	0
0,6	0,9	1,2	2,7	repetir	insatisfatório	1
0,6	1	1	2,6	repetir	repetir	0
0,6	1	1,1	2,7	repetir	insatisfatório	1
0,6	1	1,2	2,8	repetir	insatisfatório	1

Coelho 1	Coelho 2	Coelho 3	Soma dos 3 coelhos	F. Brasileira	F. Europeia	Comparação
0,6	1,1	1,1	2,8	repetir	insatisfatório	1
0,6	1,1	1,2	2,9	repetir	insatisfatório	1
0,6	1,2	1,2	3	repetir	insatisfatório	1
0,7	0,7	0,7	2,1	repetir	repetir	0
0,7	0,7	0,8	2,2	repetir	repetir	0
0,7	0,7	0,9	2,3	repetir	repetir	0
0,7	0,7	1	2,4	repetir	repetir	0
0,7	0,7	1,1	2,5	repetir	repetir	0
0,7	0,7	1,2	2,6	repetir	repetir	0
0,7	0,8	0,8	2,3	repetir	repetir	0
0,7	0,8	0,9	2,4	repetir	repetir	0
0,7	0,8	1	2,5	repetir	repetir	0
0,7	0,8	1,1	2,6	repetir	repetir	0
0,7	0,8	1,2	2,7	repetir	insatisfatório	1
0,7	0,9	0,9	2,5	repetir	repetir	0
0,7	0,9	1	2,6	repetir	repetir	0
0,7	0,9	1,1	2,7	repetir	insatisfatório	1
0,7	0,9	1,2	2,8	repetir	insatisfatório	1
0,7	1	1	2,7	repetir	insatisfatório	1
0,7	1	1,1	2,8	repetir	insatisfatório	1
0,7	1	1,2	2,9	repetir	insatisfatório	1
0,7	1,1	1,1	2,9	repetir	insatisfatório	1
0,7	1,1	1,2	3	repetir	insatisfatório	1
0,7	1,2	1,2	3,1	repetir	insatisfatório	1
0,8	0,8	0,8	2,4	repetir	repetir	0
0,8	0,8	0,9	2,5	repetir	repetir	0
0,8	0,8	1	2,6	repetir	repetir	0
0,8	0,8	1,1	2,7	repetir	insatisfatório	1
0,8	0,8	1,2	2,8	repetir	insatisfatório	1
0,8	0,9	0,9	2,6	repetir	repetir	0
0,8	0,9	1	2,7	repetir	insatisfatório	1
0,8	0,9	1,1	2,8	repetir	insatisfatório	1
0,8	0,9	1,2	2,9	repetir	insatisfatório	1
0,8	1	1	2,8	repetir	insatisfatório	1
0,8	1	1,1	2,9	repetir	insatisfatório	1
0,8	1	1,2	3	repetir	insatisfatório	1
0,8	1,1	1,1	3	repetir	insatisfatório	1
0,8	1,1	1,2	3,1	repetir	insatisfatório	1
0,8	1,2	1,2	3,2	repetir	insatisfatório	1
0,9	0,9	0,9	2,7	repetir	insatisfatório	1
0,9	0,9	1	2,8	repetir	insatisfatório	1
0,9	0,9	1,1	2,9	repetir	insatisfatório	1
0,9	0,9	1,2	3	repetir	insatisfatório	1
0,9	1	1	2,9	repetir	insatisfatório	1
0,9	1	1,1	3	repetir	insatisfatório	1
0,9	1	1,2	3,1	repetir	insatisfatório	1
0,9	1,1	1,1	3,1	repetir	insatisfatório	1
0,9	1,1	1,2	3,2	repetir	insatisfatório	1
0,9	1,2	1,2	3,3	repetir	insatisfatório	1
1	1	1	3	repetir	insatisfatório	1

Coelho 1	Coelho 2	Coelho 3	Soma dos 3 coelhos	F. Brasileira	F. Europeia	Comparação
1	1	1,1	3,1	repetir	insatisfatório	1
1	1	1,2	3,2	repetir	insatisfatório	1
1	1,1	1,1	3,2	repetir	insatisfatório	1
1	1,1	1,2	3,3	repetir	insatisfatório	1
1,1	1,1	1,1	3,3	repetir	insatisfatório	1