

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Nathália Pessoa Gonçalves

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DAS HEPARINAS NÃO FRACIONADAS
COMERCIALIZADAS NO BRASIL, ATRAVÉS DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE
ANTI-FATOR XA E ANTI-FATOR IIA E DO ENSAIO DE COAGULAÇÃO**

Rio de Janeiro

2017

Nathália Pessoa Gonçalves

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DAS HEPARINAS NÃO FRACIONADAS
COMERCIALIZADAS NO BRASIL, ATRAVÉS DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE
ANTI-FATOR XA E ANTI-FATOR IIA E DO ENSAIO DE COAGULAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Preceptores: Renata Jurema Medeiros
Tiago Savignon Cardoso Machado
Tutor: João Ferreira Martins

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Gonçalves, Nathália Pessoa

Avaliação da potência das heparinas não fracionadas comercializadas no Brasil, através dos ensaios de atividade anti-fator Xa e anti-fator IIa e do ensaio de coagulação. / Nathália Pessoa Gonçalves. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2017.

52 f.: il., tab.

Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2017.

Preceptores: Renata Jurema Medeiros; Tiago Savignon Cardoso Machado

Tutora: João Ferreira Martins

1. Heparina. 2. Controle de Qualidade. 3. Potência. I. Título

Nathália Pessoa Gonçalves

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DAS HEPARINAS NÃO FRACIONADAS
COMERCIALIZADAS NO BRASIL, ATRAVÉS DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE
ANTI-FATOR XA E ANTI-FATOR IIA E DO ENSAIO DE COAGULAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Fausto Klabund Ferraris (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Bianca Fernandes Glauser (Doutor)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Renata Jurema Medeiros (Doutor) – Preceptor
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Tiago Savignon Cardoso Machado (Doutor) – Preceptor
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

João Ferreira Martins (Doutor) – Tutor
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua fidelidade e por ter me sustentado até aqui

Aos meus pais, principalmente a minha mãe Isa por todo suporte e amor.

Ao meu marido Thales, por todo amor e paciência.

A Pós-Graduação do INCQS pela oportunidade da residência.

Ao Ministério da Saúde pela bolsa.

Ao LabFis, pelos ensinamentos, atenção e experiências transmitidas.

RESUMO

Introdução: A heparina é um fármaco que possui atividade anticoagulante, usada há mais de 90 anos. Não possuem atividade anticoagulante intrínseca, mas se ligam à antitrombina e aceleram a taxa de inibição de várias proteases envolvidas no processo de coagulação. Sua ligação com a antitrombina se dá por meio de uma sequência pentassacarídica específica que induz uma mudança conformacional na antitrombina tornando seu local reativo mais acessível para a protease alvo. Entre 2007 e 2008, o mercado mundial enfrentou um período conturbado em relação à confiabilidade das heparinas, após a notificação de reações alérgicas e óbitos causados pelo seu uso. Devido à adulteração da heparina com condroitina sulfatada, houve uma diminuição da confiabilidade deste fármaco, tornando-se necessário um controle mais rigoroso. Em 2012, a ANVISA e o INCQS firmaram um termo de cooperação para análise de amostras de heparina, nas formas de insumo e produto acabado, no qual o Laboratório de Fisiologia (INCQS) ficou responsável por realizar o ensaio de potência. **Objetivo:** Realizar o controle de qualidade das heparinas sódicas não fracionadas, comercializadas no Brasil, e de matéria prima em base seca, de origem suína e bovina, através de ensaios de potência. **Materiais e Métodos:** Foram analisadas 64 amostras de heparina sódica não fracionada, sendo 39 da marca A, e 25 da marca B, além de 4 amostras de matéria-prima, de origem suína e bovina, através dos ensaios de atividade anti-Fator Xa e anti-Fator IIa, conforme disposto na 39ª edição da *United States Pharmacopeia*, e através ensaio de coagulação, disposto na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira. **Resultados e Discussão:** 40 amostras de heparina não fracionada foram aprovadas nos três ensaios de potência, 24 foram consideradas insatisfatórias, sendo 23 da marca A e 1 da marca B. Dentre as 24 amostras insatisfatórias, 8 foram reprovadas nos três ensaios, 4 foram reprovadas no ensaio anti-FIIa e no ensaio de coagulação, 1 foi reprovada somente nos ensaios cromogênicos, 2 foram reprovadas somente no ensaio de atividade anti-FIIa e 8 foram reprovadas apenas no ensaio de coagulação, todas com potência superior a 110%. 1 amostra foi reprovada somente no ensaio de anti-FIIa com potência inferior a 90%. As três amostras de matérias-primas de origem suína foram consideradas satisfatórias, as outras três de origem bovina, demonstrou ter menor potência do que as de origem suína. **Conclusão:** As amostras insatisfatórias que apresentaram potência superior a 110% podem representar risco de sangramento para os pacientes. Dessa forma, torna-se necessário o monitoramento contínuo das heparinas, a fim de diminuir os riscos inerentes ao seu uso salvaguardando a saúde pública.

Palavras-Chave: Heparina. Controle de qualidade. Ensaio de potência

ABSTRACT

Introduction: Heparin is a drug that has anticoagulant activity, used for more than 90 years. They do not possess intrinsic anticoagulant activity, but bind to antithrombin and accelerate the rate of inhibition of several proteases involved in the coagulation process. Its binding to antithrombin occurs through a specific pentasaccharide sequence that induces a conformational change in antithrombin making its reactive site more accessible to the target protease. Between 2007 and 2008, the world market faced a troubled period in relation to the reliability of heparins, after reporting allergic reactions and deaths caused by their use. Due to the adulteration of heparin with sulfated chondroitin, there was a decrease in the reliability of this drug, requiring a more rigorous control. In 2012, the ANVISA and INCQS signed a cooperation agreement for analysis of heparin samples, in the forms of input and product finished, in which the Physiology Laboratory (INCQS) was responsible for conducting the potency assays. **Objective:** Perform quality control of sodic unfractionated heparins, commercialized in Brazil, and raw material on a dry basis, of porcine and bovine origin, through potency assays. **Materials and Methods:** A total of 64 samples of unfractionated sodium heparin were analyzed, 39 of brand A and 25 of brand B, in addition to 4 samples of raw material of porcine and bovine origin, through anti-Factor Xa and anti-Factor IIa, according to the 39th edition of the United States Pharmacopeia, and through coagulation assay, arranged in the 5th edition of the Brazilian Pharmacopoeia. **Results and Discussion:** 40 samples unfractionated heparin were approved in three potency assays, 24 were found unsatisfactory, being 23 of brand A and of brand B. Of the 24 unsatisfactory samples, 8 were reproved in the three tests, 4 were reproved in the anti-FIIa assay and in the coagulation assay, 1 was reproved only in the chromogenic assays, 2 were reproved only in the anti-FIIa activity assay and 8 were reproved only in the coagulation assay, all with potency greater than 110%. 1 sample was reproved only in the anti-FIIa assay with potency less than 90%. The three samples of raw materials of suine origin were considered satisfactory, the other three samples of bovine origin, was shown to have lower potency than those of suine origin. **Conclusion:** Unsatisfactory samples with potency more than 110% may represent bleeding risk for patients. Thus, is necessary continuous monitoring of heparins, in order to reduce the risks inherent to their use, safeguarding public health.

Keywords: Heparin. Quality control. Potency assays

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da heparina -----	13
Figura 2 - Modelo da Cascata de Coagulação Sanguínea: fases de iniciação, amplificação e propagação -----	17
Figura 3 - Estrutura pentassacarídica de ligação da heparina a antitrombina -----	19

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Total de amostras (64) de heparina sódica não fracionada, analisadas por ensaio de atividade anti-FXa e atividade anti-FIIa ----- 37

Gráfico 2 - Amostras de heparina sódica não fracionada, analisadas por ensaio de atividade anti-FXa e atividade anti-FIIa, separadas por marca A (total de 39 amostras) e marca B (total de 25 amostras) ----- 38

Gráfico 3 - Total de amostras (64) de heparina sódica não fracionada, analisadas por ensaio de coagulação ----- 39

Gráfico 4 - Amostras de heparina sódica não fracionada, analisadas por ensaio de coagulação e separadas por marca A (total de 39 amostras) e marca B (total de 25 amostras) ----- 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Total de amostras insatisfatórias (24) divididas por ensaio -----	40
Tabela 2 - Resultado dos ensaios de atividade anti-FXa e anti-FIIa para matéria-prima -----	40
Tabela 3 - Resultado dos ensaios de coagulação para matéria-prima -----	41

LISTA DE SIGLAS

μl	microlitro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPFM	Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos
CDC	Centro de Controle e Prevenções de Doenças
CTT	Comitê Técnico Temático
Da	Dalton
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fator IIa	Fator II ativado
Fator Va	Fator V ativado
Fator VIIa	Fator VII ativado
Fator Xa	Fator X ativado
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FIXa	Fator IX ativado
FP4	Fator Plaquetário 4
FT	Fator Tecidual
FVa	Fator V ativado
FVIIIa	Fator VIII ativado
FvW	Fator de von Willebrand
FXa	Fator X ativado
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISMP	Instituto para práticas seguras no uso de medicamentos
M	Molar
mg	miligrama
mM	Milimolar
mm^3	Milímetro cúbico
NaCl	Cloreto de sódio
nKat	Nanokatal
nm	Nanômetro
n°	Número
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEG	Polietilenoglicol

pH	Potencial hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SBCCV	Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SUS	Sistema Único de Saúde
TIH	Trombocitopenia induzida por heparina
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TTPa	Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada
UI	Unidade Internacional
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>

SUMÁRIO

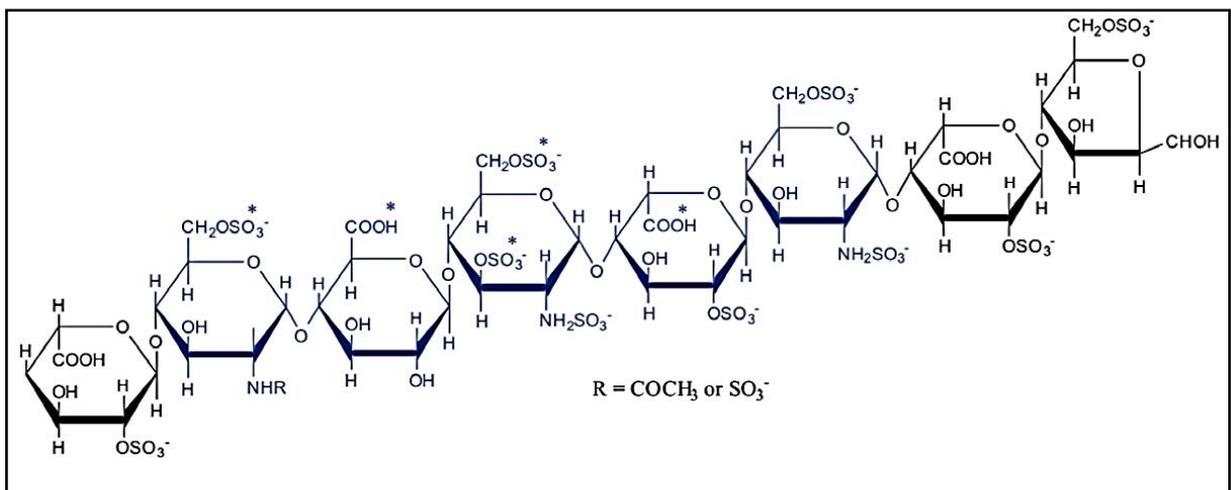
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 FISIOLOGIA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	15
1.2 MECANISMO DE AÇÃO DAS HEPARINAS	18
1.3 COMPLICAÇÕES DO USO DA HEPARINA	19
1.4 A HEPARINA NO CENÁRIO MUNDIAL	22
1.5 CONTROLE DE QUALIDADE	24
1.5.1 Normatização da heparina	25
1.5.2 Normatização da heparina no Brasil	27
1.5.3 Papel do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde no controle de qualidade	28
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 AMOSTRAGEM	32
3.2 ENSAIOS CROMOGÊNICOS DE ATIVIDADE ANTI-FXA E ATIVIDADE ANTI-FIIA	32
3.2.1 Preparo da amostra	32
3.2.1.1 <i>Produto acabado</i>	32
3.2.1.2 <i>Matéria-prima</i>	32
3.2.2 Preparo do Padrão	33
3.2.3 Ensaio de atividade anti-FXa	33
3.2.4 Ensaio de atividade anti-FIIa	34
3.2.5 Análise estatística	34
3.3 ENSAIO DE COAGULAÇÃO	35
3.3.1 Preparo da amostra	35
3.3.1.1 <i>Produto acabado</i>	35
3.3.1.2 <i>Matéria-prima</i>	35
3.3.2 Preparo do Padrão	35
3.3.3 Procedimento do ensaio de coagulação	36
3.3.4 Análise estatística	36
4 RESULTADOS	37

4.1 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DAS AMOSTRAS DE HEPARINA SÓDICA NÃO FRACIONADA -----	37
4.1.1 Ensaio cromogênicos de atividade anti-FXa e anti-FIIa -----	37
4.1.2 Ensaio de coagulação -----	38
4.2 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DAS AMOSTRAS DE MATÉRIAS-PRIMAS ---	40
4.2.1 Ensaio cromogênicos de atividade anti-FXa e anti-FIIa -----	40
4.2.2 Ensaio de coagulação -----	41
5 DISCUSSÃO -----	42
5.1 Potências obtidas nas amostras de heparina sódica não fracionada -----	42
5.2 Potências obtidas nas amostras de matérias-primas -----	43
5.3 Ensaio cromogênicos <i>versus</i> ensaio de coagulação -----	44
6 CONCLUSÃO -----	46
REFERÊNCIAS -----	47

1 INTRODUÇÃO

A heparina é um fármaco que possui atividade anticoagulante, usada há muito anos, com grande importância na clínica e presente na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde. Estruturalmente são glicosaminoglicanos sulfatados de peso molecular variável, compostos de unidades de glicosamina e ácido hexurônico, que se alternam unidas por ligações glicosídicas. O polímero apresenta grande heterogeneidade estrutural devido à sulfatação e acetilação variáveis, bem como a distribuição das unidades de ácido hexurônico (Figura 1) (MULLOY et al., 2016. VACCARI et al., 2003).

Figura 1- Estrutura da heparina



fonte: MULLOY, et al, 2016

A primeira descrição da heparina como um anticoagulante foi registrado numa série de publicações por Maurice Doyon em 1910-1911, de forma acidental. Em 1918, William Howell aprimorou o método de purificação, mas somente na década de 1920 o potencial clínico da heparina foi reconhecido (MULLOY et al., 2016).

Na década de 1930 iniciaram-se os estudos *in vivo* em animais, e logo após, em torno de 1935, as preparações terapêuticas já estavam disponíveis para testes clínicos e para o desenvolvimento comercial, liderado por Charles Best com o laboratório Connaught no Canadá e Erik Jorpes com a empresa Vitrum na Suécia. A passagem de experimentos com animais para os primeiros estudos clínicos foi notavelmente rápida pelos padrões de hoje, especialmente

considerando que a características química e estrutural, e grau de purificação da heparina disponível ainda eram incertos. Uma das razões para a rápida aceitação da heparina na clínica foi devido a ser uma substância de origem biológica (LEVER et al., 2012).

Em 1976, Johnson e colaboradores confirmaram a natureza polidispersa da heparina e encontraram uma ampla faixa de variação no peso molecular. Ainda no mesmo ano, descobriram que frações de alto e baixo peso molecular da heparina possuíam tempos de meia-vida diferentes. As frações de baixo peso molecular possuem uma meia-vida mais longa do que as frações de heparina de alto peso molecular e da heparina não fracionada, demonstrado por ensaio anti-FXa. Este marco no estudo da heparina levou ao desenvolvimento de heparina de baixo peso molecular para uso clínico no final de 1970 (MULLOY et al., 2016).

Os fármacos disponíveis comercialmente são isolados e extraídos em grande parte da mucosa intestinal de suínos e secundariamente do tecido pulmonar bovino, principalmente devido ao risco de contaminação por príons causadores da encefalopatia espongiforme de bovinos (FILHO et al., 2008). O método de extração envolve a hidrólise de uma mistura aquosa de mucosa com enzimas proteolíticas sob aquecimento, seguida pela adsorção dos poliânions sulfatados para uma resina de troca iônica, sendo estes posteriormente recuperados. Este processo de isolamento e extração leva à degradação parcial das cadeias de glicosaminoglicanos que a compõem, produzindo um fármaco formado por fragmentos de pesos moleculares heterogêneos, variando de 3.000 a 30.0000 Da, conhecido como heparina não fracionada, heparina convencional ou simplesmente heparina (FILHO, 2009, JUNQUEIRA et al, 2011). Já as heparinas de baixo peso molecular são frações da heparina não fracionada produzidas a partir da despolimerização controlada de suas cadeias de polissacarídeos, seja quimicamente ou por uma reação enzimática. Neste processo seu peso molecular é reduzido à média de 4.000 a 6.000 Da (FILHO, 2009).

Devido às diferentes potências de ação anticoagulante apresentada pelas diferentes frações com pesos moleculares distintos, e também devido à ligação da heparina a células e proteínas plasmáticas, as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da heparina apresentam grande heterogeneidade (JUNQUEIRA et al., 2011).

As vantagens da heparina de baixo peso molecular sobre a heparina não fracionada são a maior biodisponibilidade, vida média menor após a aplicação, absorção completa por via subcutânea e menor incidência de trombocitopenia. A limitação das heparinas de baixo peso molecular é sua inadequada neutralização pelo sulfato de protamina em casos de sangramento (STAICO et al., 2004, TOMAI et al., 2013).

Estima-se que no mundo aproximadamente 20 milhões de pacientes recebam o fármaco

para tratamento ou profilaxia de trombooses venosas ou arteriais (FILHO et al., 2008).

1.2 FISIOLOGIA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

O processo fisiológico da hemostasia tem como objetivo principal a manutenção da integridade vascular e da fluidez do sangue após uma lesão vascular, permitindo assim, o equilíbrio do sistema circulatório. Nesse processo estão inseridas interações complexas entre os vasos sanguíneos, plaquetas, proteínas da coagulação e componentes do sistema fibrinolítico, levando à formação do coágulo sanguíneo e posterior dissolução do mesmo após o reparo da injúria vascular.

A hemostasia primária representa a primeira fase da formação do trombo, podendo ser dividida em: vasoconstrição, adesão, ativação e agregação plaquetária. A vasoconstrição se inicia como um evento inicial passageiro, com o objetivo de retardar a perda sanguínea extravascular e diminuir o fluxo sanguíneo local. A adesão da plaqueta ao vaso lesado ocorre pela interação ao receptor de plaqueta e, por fim, leva à formação de uma fina camada de plaquetas na região da lesão vascular. Durante a agregação plaquetária ocorre a formação do tampão hemostático primário no local da lesão vascular. O tampão hemostático primário é um evento passageiro, que inibe momentaneamente o sangramento e fornece uma superfície pró-coagulante para os passos seguintes da cascata da coagulação.

Durante a hemostasia secundária ocorre a ativação de uma série de reações enzimáticas envolvendo as proteínas pró-coagulantes presentes no plasma que levam à formação do coágulo sanguíneo. Nesse processo estão compreendidas três fases distintas: iniciação, amplificação e propagação (RODRIGUES et al., 2012).

A fase de iniciação ocorre nas células que expressam Fator Tecidual (FT) em sua superfície, tais como as células endoteliais, monócitos, fibroblasto, entre outras. O Fator Tecidual é exposto na circulação quando ocorre de uma injúria vascular ou ativação das células endoteliais, monócitos, ou micropartículas oriundas de vários tipos de células, levando a formação de um complexo entre o Fator Tecidual e pequenas quantidades de Fator VIIa. Esse complexo formado FT/FVIIa inicia a coagulação por ativar o Fator X e Fator IX. O Fator Xa ativa o Fator V. Após a ativação, o Fator Va associa-se ao Fator Xa e forma o complexo protrombinase, FXa/FVa. Esse complexo é capaz de converter a protrombina (Fator II) em traços de trombina (Fator IIa). Além disso, o Fator IXa gerado pode se deslocar para outra célula

ou para a superfície das plaquetas tornando-as ativas e assim iniciar a fase de amplificação da coagulação (HOFFMAN, MONROE, 2001; MONROE; HOFFMAN; ROBERTS, 2002, RODRIGUES et al., 2012).

A fase da amplificação ocorre na superfície das plaquetas. A pequena quantidade de trombina gerada na fase de iniciação desempenha algumas reações, tais como: ativar as plaquetas; ativar o Fator V na superfície das plaquetas; dissociar o complexo FVIII:Fator de von Willebrand e ativar o Fator XI na superfície das plaquetas. O Fator de von Willebrand livre participa da adesão e agregação plaquetária no local da lesão vascular. Após os fatores serem ativados na superfície das plaquetas, inicia-se a fase de propagação (HOFFMAN, MONROE, 2001; MONROE; HOFFMAN; ROBERTS, 2002 RODRIGUES et al., 2012).

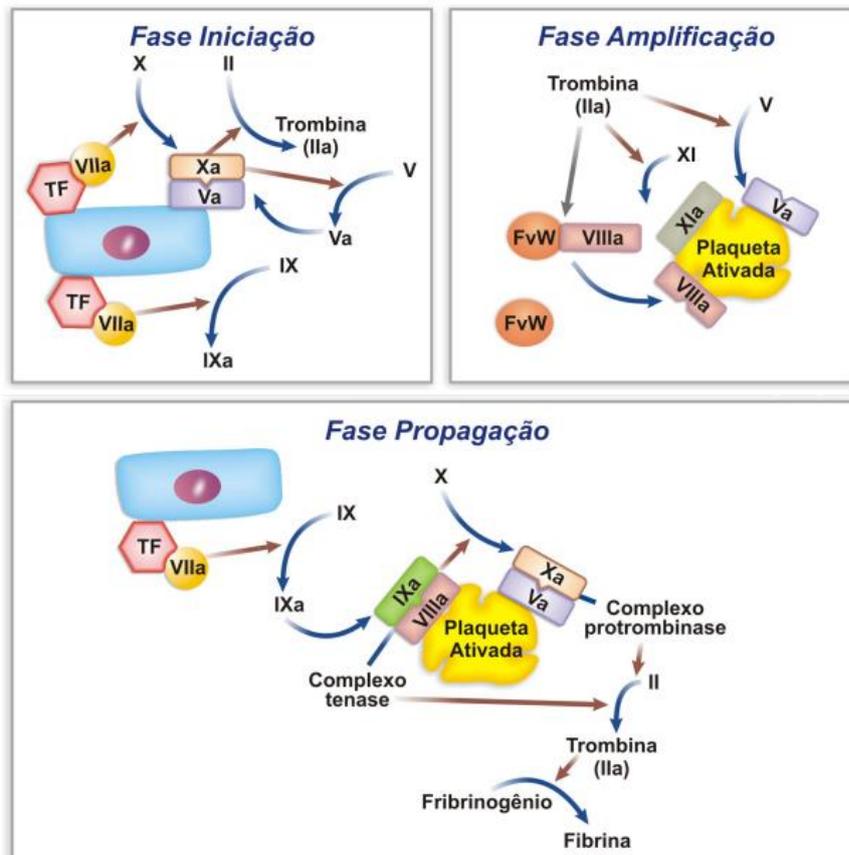
A fase de propagação também ocorre na superfície das plaquetas. O Fator IX ativado na fase de iniciação associa-se ao Fator VIIIa liberado na fase de amplificação formando o complexo tenase, FIXa/FVIIIa. O complexo tenase, por sua vez, ativa o Fator X. O Fator Xa associa-se ao seu cofator Fator Va e forma o complexo protrombinase FXa/FVa. Nessa fase, grandes quantidades de plaquetas são recrutadas para o local da lesão e são formados inúmeros complexos tenase (FIXa/FVIIIa) e protrombinase (FXa/FVa) na superfície das mesmas. Conseqüentemente, grandes quantidades de protrombina são convertidas em trombina que resulta na clivagem de fibrinogênio em monômeros de fibrina. A fibrina se polimeriza e resulta na formação de coágulo estável de fibrina (Figura 2) (HOFFMAN, MONROE, 2001; MONROE; HOFFMAN; ROBERTS, 2002, RODRIGUES et al., 2012).

Normalmente não ocorre ativação das plaquetas e nem da coagulação sanguínea nos vasos que estão intactos. Quando há um endotélio vascular saudável, vários meios reguladores sintetizados pelas células endoteliais são liberados no sangue, como por exemplo, o óxido nítrico e prostaciclina; eles induzem a vasodilatação, inibem a ativação plaquetária e subsequentemente a agregação. Outra forma de regulação é através do sistema regulatório que envolve a proteína C e a proteína S, que são proteínas dependentes da vitamina K, responsáveis por diminuir a velocidade da cascata de coagulação por meio da inativação dos fatores da coagulação Va e VIIIa. A proteína C e a proteína S fazem parte de um mecanismo de controle por retroalimentação, em que a geração excessiva de trombina leva à ativação da proteína C, que, por sua vez, ajuda a impedir a oclusão do lúmen vascular pelo coágulo de fibrina em crescimento (GOODMAN, GILMAN, 2012. KATZUNG, 2014).

Além disso, há também a antitrombina, um anticoagulante endógeno, que age inibindo diretamente a trombina, e aumentando a degradação da fibrina, através da transformação de plasminogênio em plasmina, que por sua vez, agirá na fibrina clivando-a e consequentemente

destrói o coágulo. A antitrombina, que é sintetizada no fígado e nas células endoteliais, tem uma importância particular, por sua capacidade de bloquear a ação da trombina, do FIXa, FXa e FXIa. Esta inativação não é rápida, permitindo que a trombina produza fibrina antes de ser inativada através da formação do complexo enzima-antitrombina. Por outro lado, a grande concentração de antitrombina no sangue é capaz de impedir que a trombina se espalhe para regiões fora da lesão (GOLAN et al., 2014. GOODMAN, GILMAN, 2012. LEVY, MEIS, 2006. KATZUNG, 2014).

Figura 2 – Modelo da Cascata de Coagulação Sanguínea: fases de iniciação, amplificação e propagação. Na fase de iniciação: células ou micropartículas expõem o FT que se associa ao FVIIa formando o complexo FT/VIIa. A seguir, o complexo TF/VIIa ativa o FX. O FXa ativa o FV. Esse se associa ao FXa e converte FII em trombina. Além disso, o complexo FT/VIIa ativa o FIX. Na fase de amplificação, o traço de trombina gerado ativa a plaqueta. Na superfície da plaqueta ativada são ativados os fatores: Va, XIa e VIIIa. Esse último é ativado após dissociar-se do complexo FvW/FVIIIa. Com esses fatores ativados na superfície da plaqueta ativada, inicia-se a fase de propagação. Nessa fase são formadas grandes quantidades dos complexos: tenase (FIXa/FVIIIa) e protrombinase (FXa/FVa). Esses complexos ativam a protrombina formando trombina. Esta última converte fibrinogênio em fibrina, a qual após a polimerização forma o coágulo de fibrina.



fonte: (RODRIGUES et al., 2012)

1.2 MECANISMO DE AÇÃO DAS HEPARINAS

As heparinas não possuem atividade anticoagulante intrínseca, elas se ligam à antitrombina e aceleram a taxa na qual ela inibe várias proteases da coagulação. A ligação da heparina à antitrombina se dá por meio de uma sequência pentassacarídica específica, que contém um resíduo de glicosamina 3-O-sulfatado; essa ligação induz uma mudança conformacional na antitrombina tornando seu local reativo mais acessível para a protease-alvo (Figura 3). A taxa de inibição do Fator Xa é acelerada pela mudança conformacional da antitrombina em, pelo menos, duas ordens de magnitude, no entanto, não há efeito na taxa de inibição da trombina. Com o objetivo de aumentar a taxa de inibição da trombina pela antitrombina, a heparina não fracionada age como um modelo catalítico, no qual o inibidor e a protease se ligam, ou seja, para que a trombina seja inibida, a heparina se liga simultaneamente a antitrombina e a trombina (GOODMAN, GILMAN, 2012).

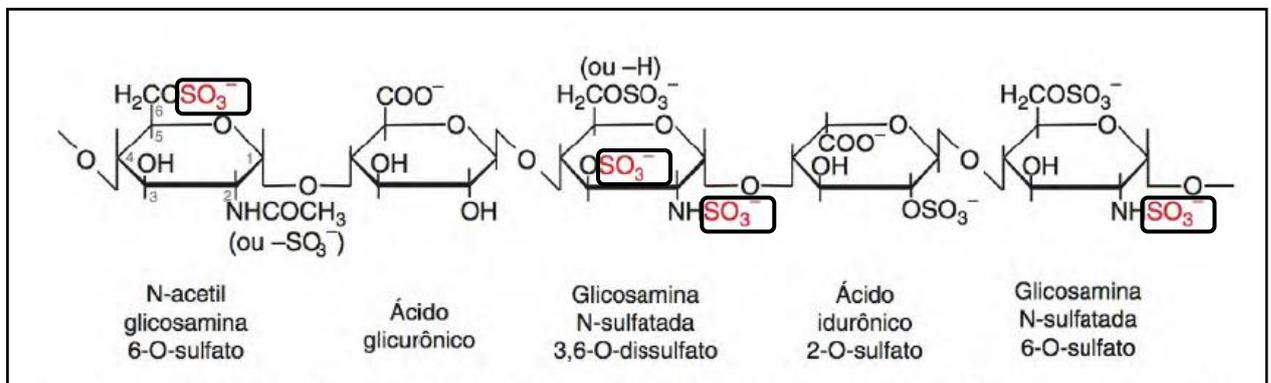
Somente moléculas de heparina composta de 18 unidades ou mais de monossacarídeos (peso molecular > 5.400 Da) possuem comprimento suficiente para unir a antitrombina e a trombina, sendo assim, a maioria das cadeias é longa o suficiente para esta função, uma vez que a média das cadeias tem em torno de 15.000 Da. Dessa maneira, a heparina é capaz de catalisar as taxas de Fator Xa e da trombina em uma extensão semelhante, expresso por uma proporção de anti-Fator Xa para anti-Fator IIa (trombina) de 1:1. Já as heparinas de baixo peso molecular, com peso molecular médio de 5000 Da e aproximadamente 17 unidades de sacarídeo, são pequenas demais para realizar a ligação simultânea da heparina à antitrombina e a trombina, dessa forma quase não possuem efeito na taxa de inibição da trombina. No entanto, também são capazes de induzir a mudança conformacional na antitrombina, acelerando a taxa de inibição do Fator Xa. (GOODMAN, GILMAN, 2012).

A principal limitação do uso da heparina não fracionada é sua propensão de se ligar a proteínas e superfícies carregadas positivamente. As limitações farmacocinéticas são causadas pela ligação da heparina às proteínas do plasma, proteínas derivadas de plaquetas e células endoteliais, independentemente da antitrombina, resultando em uma resposta anticoagulante variável devido à inativação de parte da heparina circulante. Outras limitações incluem: a incapacidade da heparina inativar o Fator Xa no complexo protrombinase ou inativar a trombina ligada à fibrina ou na superfície subendotelial (HIRSH et al, 2001. STAICO et al., 2004).

As heparinas de baixo peso molecular se ligam menos às proteínas plasmáticas e às células endoteliais e, por isso possuem uma taxa de eliminação, resposta à dose e bioatividade

mais previsíveis. Possuem também uma meia-vida plasmática duas a quatro vezes maiores do que as heparinas não fracionadas, além de maior absorção subcutânea, o que permite a aplicação de doses mais espaçadas. Também possui menor interação com as plaquetas, Fator de Von Willebrand, endotélio e atuam menos intensamente sobre a permeabilidade vascular, o que teoricamente proporcionaria menos hemorragias do que as heparinas não fracionadas. Outra vantagem importante das heparinas de baixo peso molecular diz respeito ao monitoramento laboratorial, já que esta é desnecessária na maioria dos pacientes, consequência da consistência da sua relação dose-efeito (HIRSH et al, 2001. STAICO et al., 2004).

Figura 3 – Estrutura pentassacarídica de ligação da heparina a antitrombina. Os grupos sulfatos necessários para a ligação à antitrombina estão destacados



fonte: (GOODMAN, GILMAN, 2012).

1.3 COMPLICAÇÕES DO USO DA HEPARINA

O uso da heparina na prática clínica é indicado para o tratamento e profilaxia de eventos tromboembólicos venosos (trombose venosa profunda e embolismo pulmonar) e arteriais (fibrilação atrial, angina instável, infarto do miocárdio e embolia arterial periférica), no tratamento da coagulação intravascular disseminada e em períodos de interrupção temporária de terapia anticoagulante oral. Também são usadas como anticoagulante em procedimentos dialíticos, transfusões sanguíneas, circulação extracorpórea e em cirurgias arteriais e cardíacas (ISMP- Brasil, 2013).

A resposta terapêutica à heparina varia de indivíduo para indivíduo. Dessa forma, é importante o monitoramento de sua efetividade e segurança por meio da análise de exames laboratoriais, como o de Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa), que é um teste

utilizado para avaliar todos os fatores de coagulação, exceto plaquetas, por meio da determinação do tempo necessário à formação de um trombo de fibrina a uma amostra de plasma, para pacientes submetidos a cirurgias cardíacas e arteriais ou que demandem altas doses de heparina (HAMERSCHLAK, ROSENFELD, 1996. ISMP- Brasil, 2013).

De acordo com o *Institute for Healthcare Improvement*, Instituto norte americano que oferece cursos educacionais de qualidade e segurança a profissionais da saúde, a heparina não fracionada pertence a uma das dez categorias de medicamentos considerados de alto risco ou medicamentos potencialmente perigosos, que são aqueles que apresentam risco aumentado de provocar danos significativos aos pacientes em decorrência de falha no processo de utilização. Esses medicamentos estão relacionados com a maioria dos eventos adversos no contexto hospitalar. Estima-se que a heparina sódica e outros anticoagulantes apareçam como um dos grupos medicamentosos mais comumente envolvidos em eventos adversos, variando de 3 a 5,7% do total de eventos adversos com medicamentos (CAMERINI, SILVA, 2014).

O uso terapêutico da heparina pode aumentar o risco de desenvolvimento de sequelas tromboembólicas, incluindo trombose venosa, trombose arterial periférica, infarto do miocárdio e choque, além da trombocitopenia, que é a complicação não hemorrágica mais frequente do uso de heparina (CAMERINI, SILVA, 2014).

A trombocitopenia induzida por heparina (TIH) é uma síndrome imuno-hematológica que culmina em ativação plaquetária na presença de heparina, induzindo à sua agregação e podendo provocar graves complicações trombóticas. A TIH apresenta duas formas: a TIH tipo I, menos severa, que ocorre em cerca de 20 a 25% dos pacientes tratados com heparina, e a TIH tipo II, mais severa, que ocorre em 2 a 5% dos pacientes que recebem heparina (LONGI, LAKS, KALIL, 2001. PIMENTA et al., 2016).

A TIH tipo I é caracterizada por uma trombocitopenia leve que geralmente inicia precocemente após o uso da heparina, mas que pode ocorrer mais tardiamente. Não há eventos clínicos associados à TIH tipo I, que provavelmente é causada pelo efeito direto da heparina nas plaquetas, resultando na sua agregação. Caracteriza-se por uma supressão não imunológica, benigna, transitória e moderada, da produção e do número de plaquetas. O diagnóstico clínico e laboratorial é definido nos dois primeiros dias após o início da terapia com heparina, quando ocorre uma moderada trombocitopenia, raramente a contagem plaquetária é inferior a $100.000/\text{mm}^3$ (LONGI, LAKS, KALIL, 2001. PIMENTA et al., 2016).

A TIH tipo II é uma síndrome imuno-hematológica mediada por um anticorpo que causa ativação plaquetária na presença de heparina e induz à agregação plaquetária. Após a primeira exposição à heparina, entre o quinto e o décimo quarto dia de terapia, a contagem plaquetária

pode sofrer redução igual ou superior a 50% em relação à contagem plaquetária antes do início do uso da heparina (geralmente inferior a $100.000/\text{mm}^3$) e pode estar associada a graves complicações trombóticas, com chance de levar à morte (LONGI, LAKS, KALIL, 2001. PIMENTA et al., 2016).

Outras reações adversas, como hipersensibilidade, tremores, cefaleia, hiperpotassemia e priapismo, podem ocorrer em decorrência do uso de heparina. Entretanto, hemorragias configuram o principal evento adverso associado ao uso da heparina, e o risco de sua incidência aumenta conforme a dose utilizada, uso concomitante de outros agentes anticoagulantes e/ou presença de fatores predisponentes ao sangramento (CAMERINI, SILVA, 2014).

Estima-se que de 5 a 10% dos pacientes que usam heparina não fracionada apresentem algum tipo de sangramento, como hematúria, hemorragia digestiva alta, hemoptise, epistaxe, equimose, melenas e hematomas. Os eventos hemorrágicos, como complicações do uso da infusão contínua de heparina sódica, preocupam, pois em função do local ou órgão afetado e do volume de sangue comprometido pode-se potencializar a instabilidade hemodinâmica, a ventilatória, aumentar a mortalidade, o tempo de internação, além de requerer medidas de intervenção (CAMERINI, SILVA, 2014).

A frequência de fenômenos hemorrágicos aparentemente, não se relacionam a alterações dos níveis de TTPa e sim a fatores de risco individuais. A observação de condições que possam impedir à terapêutica constitui a principal forma de prevenção de fenômenos hemorrágicos. Os principais grupos com maior risco de complicações hemorrágicas são pacientes idosos, devido à alta sensibilidade, pois têm menor absorção de ferro decorrente da idade e apresentam menor quantidade de líquido corporal; presença de hipertensão arterial, pois a pressão exercida nos vasos relacionada à utilização de anticoagulante pode aumentar de forma considerável a ocorrência de sangramento; e insuficiência renal, pois pode prolongar o efeito anticoagulante da heparina, já que essa tem eliminação renal. (CAMERINI, SILVA, 2014. HAMERSCHLAK, ROSENFELD, 1996. JUNQUEIRA et al., 2011).

A ação anticoagulante excessiva da heparina é tratada com a interrupção do fármaco. Em geral, o sangramento leve pode ser controlado sem a administração de um antagonista. Em casos de hemorragia potencialmente fatal, o efeito da heparina pode ser rapidamente revertido pela infusão intravenosa de sulfato de protamina.

A protamina é um peptídeo altamente básico, de carga positiva, que se liga firmemente à heparina, de carga negativa, como par iônico, formando um complexo estável desprovido de atividade anticoagulante. A protamina também interage com plaquetas, com o fibrinogênio e

com outras proteínas plasmáticas e pode causar um efeito anticoagulante próprio. Dessa forma, deve-se administrar a quantidade mínima de protamina necessária para neutralizar a heparina presente no plasma. Para cada 100 unidades de heparina remanescente no paciente, administra-se 1mg de sulfato de protamina por via intravenosa; a velocidade da infusão não deve ultrapassar 50 mg em um período de 10 minutos. A protamina se liga apenas a moléculas longas de heparina. Portanto, ela reverte apenas parte da atividade anticoagulante das heparinas de baixo peso molecular. Como as moléculas longas de heparina são responsáveis pela atividade anti-Fator IIa da heparina de baixo peso molecular, a protamina reverte completamente esta atividade. No entanto, a protamina reverte apenas uma parte da atividade anti-Fator Xa da heparina de baixo peso molecular, que é mediada pelas moléculas menores de heparina (GOODMAN, GILMAN, 2012. KATZUNG, 2014).

1.4 A HEPARINA NO CENÁRIO MUNDIAL

Em 2008, o mercado mundial enfrentou um período crítico em relação à confiabilidade da heparina. Nesse período foi notificado ao Centro de Controle e Prevenções de Doenças (CDC), nos Estados Unidos, um conjunto de reações alérgicas em pacientes submetidos à hemodiálise em um hospital pediátrico. Os sintomas ocorreram dentro de minutos após o início de uma sessão de diálise, e incluíam edema fácil, taquicardia, hipotensão, urticária e náuseas. Foi ainda apurado pelo CDC que outros estados também identificaram reações semelhantes entre pacientes em tratamento de doenças cardíacas.

Uma característica comum que precedeu muitas das reações foi o recebimento e uso de heparina produzida pela Baxter Healthcare. No mesmo ano, a Baxter recolheu voluntariamente nove lotes de heparina (BLOSSON, 2008).

Ainda em 2008, a *Food and Drug Administration* (FDA) (órgão governamental dos Estados Unidos que faz o controle dos alimentos, suplementos alimentares, medicamentos, cosméticos, equipamentos médicos, materiais biológicos e produtos derivados do sangue humano), anunciou que havia identificado um contaminante na heparina fabricada pela Baxter. A matéria-prima utilizada pela Baxter de origem chinesa, estava contaminada com sulfato de condroitina supersulfatada. Este também é um fármaco, porém não possui atividade anticoagulante. No entanto, quando quimicamente modificado por meio de supersulfatação, adquire característica anticoagulante, transformando-se em um mimético da heparina, não

sendo detectável por metodologia analítica convencional (ANJOS et al, 2012).

Foi veiculado que esta contaminação teria sido deliberada e que teria tido início em 2006, na província de Guangdong, China, região industrializada, onde porcos, criados para a produção de heparina, teriam sido acometidos por uma gripe porcina com grande mortalidade, com consequente queda da produção e elevação dos preços do produto (FILHO et al., 2008).

Já no início de 2009, a *United States Pharmacopeia* (USP), Farmacopeia dos Estados Unidos, publicou um informativo relatando a ocorrência de duzentas mortes em todo o mundo em virtude da adulteração da heparina com sulfato de condroitina supersulfatada, e indicando as providências tomadas, através da proposição de metodologias de controle de qualidade para avaliação de potência, identidade e pureza (FILHO, 2009).

Outro problema mundial que teve importante reflexo no Brasil foi a retirada repentina da heparina Liquemine® de uso endovenoso do laboratório Roche; neste mesmo período a Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular (SBCCV) começou a receber notificações oriundas de vários centros, relatando o aparecimento de complicações com a utilização de outras marcas de heparina disponíveis no mercado nacional, como a elevação das taxas de reoperações por sangramento após cirurgias cardíacas. A heparina Liquemine®, produzida a partir da mucosa intestinal de suínos, era utilizada por quase todos os Serviços de Cirurgia Cardiovascular do Brasil e apresentava grande confiabilidade (FILHO et al, 2008. JUNQUEIRA et al., 2011).

A crise provocada pela adulteração da heparina culminou em diversas mudanças nas ações clínicas e na produção do fármaco. Em âmbito mundial, a monografia da heparina foi revisada pela Farmacopeia dos Estados Unidos e pela Organização Mundial de Saúde com o propósito de introduzir ensaios de qualidade capazes de detectar contaminantes. Testes de identidade utilizando eletroforese capilar e ressonância magnética nuclear protônica capazes de detectar contaminantes, foram adicionados, além disso, testes adicionais e de impurezas tiveram seus limites diminuídos a fim de controlar a polidispersividade de heparina por análise de peso molecular (FILHO et al, 2008).

As mudanças na USP ocorreram em duas fases: na primeira, os fabricantes deveriam realizar testes de qualidade para detecção de possíveis contaminações, e na segunda fase foi incluído um novo ensaio de potência para heparina, o teste cromogênio de atividade anti-Fator IIa, que oferece maior especificidade e segurança adicional contra potenciais adulterantes que mimetizem a atividade da heparina. Além disso, um novo padrão de referência de potência foi adotado, a unidade de potência da heparina utilizada pela farmacopeia americana foi

harmonizada com a Unidade Internacional (UI) utilizada pela Organização Mundial de Saúde. (JUNQUEIRA et al., 2011. SMYTHE, 2010).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) iniciou um projeto de revisão das monografias da heparina cálcica e sódica contidas na Farmacopeia Brasileira. As monografias foram revisadas pelo Comitê Técnico Temático de Produtos Biológicos da Farmacopeia Brasileira, sendo publicada uma proposta de monografia em consulta pública. Os laboratórios que produziam heparina sódica injetável no Brasil tiveram seus produtos analisados, e segundo análise, as heparinas não mostraram evidência de contaminação por sulfato de condroitina supersulfatada, no entanto, foi observada a presença de contaminação com dermatan sulfato, amostras degradadas quimicamente e com significativa alteração do peso molecular. Além disso, foi demonstrado que havia clara diferença de potência de ação entre as heparinas não fracionadas de origem bovina e as de origem suína; as heparinas suínas possuíam maior potência que as bovinas (GOMES, BRAILE 2009).

De fato, a heparina bovina e a heparina suína não são fármacos equivalentes. As heparinas bovina e suína possuem diferente grau de sulfatação de seus compostos, e isso determina efeitos distintos na coagulação, trombose e sangramento. A heparina bovina também difere em sua afinidade pela protamina, substância utilizada na inibição do efeito anticoagulante do fármaco. Todas essas questões podem evidenciar a ausência de intercambialidade de doses entre as heparinas de origem bovina e suína, reforçando a necessidade de monitoramento do tratamento, e necessidade de reajuste de dose quando havia mudança do produto (JUNQUEIRA et al. 2011).

Embora as heparinas fabricadas a partir de intestino bovino sejam seguras, não são a melhor escolha para a cirurgia cardiovascular, sendo assim, com o apoio da SBCCV e da ANVISA, foi acordado que as companhias farmacêuticas passariam a desenvolver somente heparina derivada de mucosa intestinal de suínos (MELO et al., 2008). Atualmente, as duas marcas disponíveis no mercado brasileiro de heparina sódica não fracionada, em apresentação de solução injetável, são de origem suína (ANVISA 2016).

1.5 CONTROLE DE QUALIDADE

A produção de medicamentos seguros e eficazes envolve a realização de análises de controle de qualidade de matérias-primas e do produto acabado como etapa preliminar para

atingir um padrão mínimo de qualidade necessário a um medicamento. No caso de produtos de interesse para a saúde ela é um requisito que deve ser obrigatoriamente atendido, pois de é exigência legal (AMORIM, REDIGUIERI, REDIGUIERI, 2013).

Os requisitos mínimos de qualidade para fármacos, insumos, drogas vegetais, medicamentos e produtos para a saúde são de competência legal, e exclusiva, das Farmacopeias. A Farmacopeia é o Código Oficial Farmacêutico e tem por finalidade promover a saúde da população, estabelecendo requisitos de qualidade e segurança dos insumos para a saúde, especialmente dos medicamentos, apoiando as ações de regulação sanitária e induzindo ao desenvolvimento científico e tecnológico nacional (FARMACOPEIA, 2010).

Cada forma farmacêutica deve possuir especificações capazes de caracterizá-la e assegurar a qualidade e a segurança do produto acabado. No que diz respeito a produtos acabados, os ensaios de controle de qualidade são variados, e a relevância de cada ensaio está relacionada à estabilidade, à uniformidade, à segurança e à biodisponibilidade do medicamento (AMORIM, REDIGUIERI, REDIGUIERI, 2013)

O Controle de Qualidade faz parte das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPFM), o qual possui atividades envolvidas em amostragem, especificações, ensaios, procedimentos de organização, documentação e liberação que asseguram que os ensaios necessários e relevantes sejam executados e que os materiais não sejam liberados para uso, nem para venda ou fornecimento, até que a qualidade dos mesmos seja julgada satisfatória (VIEIRA, KLIER, AGELIS, 2013).

A ANVISA regulamenta as Boas Práticas de Controle de Qualidade na Indústria Farmacêutica através da Resolução RDC nº17, de 16 de abril de 2010. Esta resolução estabelece requisitos mínimos a serem seguidos na fabricação de medicamentos, para padronizar a verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos durante as inspeções sanitárias. As matérias-primas para uso na indústria farmacêutica, tanto princípios ativos quanto excipientes, estão sujeitos a requisitos de qualidade farmacêutica descritos nas BPFM (AMORIM, REDIGUIERI, REDIGUIERI, 2013. FARMACOPEIA, 2010).

1.5.1 Normatização da heparina

Um dos primeiros padrões da heparina de sal de bário, não foi considerado muito estável, além disso, era altamente ácido quando em solução, não sendo, portanto, o ideal para

um padrão. Posteriormente outro padrão foi produzido, um sal sódico, e enviado à Divisão de Normas Biológicas no Instituto Nacional de Medicina Research, no Reino Unido. Por causa da Segunda Guerra Mundial, não foi possível organizar um estudo colaborativo, e este material foi adotado de maneira provisória como um Padrão Internacional em 1942 pela Liga das Nações, a antecessora da Organização Mundial da Saúde. Após a Guerra, em 1947, este padrão foi oficialmente estabelecido pela OMS como o primeiro Padrão Internacional para a heparina com a potência de 130UI/mg (LEVER, MULLOY, PAGE, 2013).

No final dos anos 1950, um estudo colaborativo foi organizado para calibrar a substituição do primeiro Padrão. O material para o segundo é era da mesma origem que o primeiro, pulmão bovino, e oito laboratórios participaram dessa calibração. Foram utilizados diversos métodos, predominando o método da USP (4 Laboratórios); com a exceção de um laboratório, os resultados eram muito semelhantes, e a potência média geral revelou-se 130 UI/mg, ou seja, idêntico ao do primeiro padrão. Dois conjuntos de dados de um laboratório, cujos resultados foram discrepantes, partiram de métodos que envolviam plasma humano, obtendo potências mais baixas do que os métodos que utilizam plasma animal (LEVER, MULLOY, PAGE, 2013).

Por mais de 30 anos, os dois primeiros padrões serviram para harmonizar a medição global da heparina, e foram utilizados para calibrar os padrões de referência das farmacopeias, utilizados para a rotulagem da potência de produtos terapêuticos.

Os métodos desenvolvidos pelas farmacopeias norte-americana e britânica continuaram a ser usados sem alterações substanciais por parte dos fabricantes até meados da década de 1980, quando o ensaio da Farmacopeia Europeia substituiu o método da Farmacopeia Britânica. O ensaio utilizado pela a Farmacopeia Britânica, era realizado com o mesmo substrato utilizado no ensaio da USP, ou seja, plasma de ovelha não coagulado, em um método onde era medido o tempo de coagulação após a adição de um acelerador, semelhante ao ensaio clínico TTPa em plasma humano (LEVER, MULLOY, PAGE, 2013).

Os métodos baseados em coágulos utilizam a formação de fibrina como ponto final e, portanto, podem ser facilmente influenciados pela qualidade do sangue ou plasma, impurezas e contaminantes. Plasmas ovinos de diferentes produtores têm quantidades variáveis de Fator Plaquetário 4, que pode neutralizar a atividade anticoagulante de preparações de heparina.

Um desenvolvimento importante na década de 1970 foi a introdução do método anti-Fator Xa, que mede a extensão em que o Fator Xa exógeno é inibido pelo complexo formado entre as heparinas e a antitrombina; o Fator Xa residual é inversamente proporcional à concentração de heparina na amostra. Inicialmente, este FXa residual era medido por um

método de coagulação, mas posteriormente foi desenvolvida uma versão cromogênica, no qual o FXa residual cliva um substrato específico, resultando em cor. Até a década de 1980, o substrato cromogênico específicos para a trombina também se tornou disponível, no entanto, somente a partir de 2009 as farmacopeias começaram a adotar esse método para determinação da potência (GEHRIE, LAPOSATA, 2012. LEVER, MULLOY, PAGE, 2013).

Em 1960 houve uma transição gradual da fonte da heparina, de pulmão bovino para mucosa intestinal suína, e estudos colaborativos começaram a encontrar importantes diferenças entre as amostras.

O terceiro Padrão foi produzido a partir de mucosa intestinal suína, e estabelecido pela OMS em 1973. Todos os outros três Padrões produzidos desde 1973 são obtidos através de mucosa suína, o último, foi estabelecido em 2013 (LEVER, MULLOY, PAGE, 2013. MULLOY et al., 2016).

Os padrões internacionais para produtos biológicos são preparados de acordo com as recomendações da OMS. Essas recomendações são baseadas em princípios no qual o padrão de referência deve ser atribuído um valor arbitrário em vez de unidades absolutas, mas pode haver exceções, quando justificado. A unidade deve ser definida por um padrão de referência com uma existência física, além disso, no estabelecimento deve ser utilizada uma variedade de métodos. O comportamento do padrão de referência deve assemelhar, tanto quanto possível, o comportamento das amostras de ensaio (LEVER, MULLOY, PAGE, 2013).

1.5.2 Normatização da heparina no Brasil

No Brasil, as monografias das heparinas cálcica e sódica entraram na Farmacopeia Brasileira na 4ª edição, publicada em 2004. Esta edição contava com alguns testes, como o ensaio de pirogênio, endotoxina, esterilidade bacteriana, e determinação de potência através do ensaio de atividade anti-Fator Xa para matéria-prima e solução injetável. No escopo do projeto de revisão deste compêndio, iniciado em 2008 pela ANVISA, estas monografias foram revisadas pelo Comitê Técnico Temático de Produtos Biológicos da Farmacopeia Brasileira (CTT Produtos Biológicos), sendo publicada uma proposta de monografia em consulta pública em 2013.

Durante todo o processo de revisão destas monografias, especial atenção foi dada por parte do CTT Produtos Biológicos, considerando os fatos que ocorreram nos Estados Unidos e

Europa, causados pela contaminação da heparina de origem chinesa com sulfato de condroitina supersulfatada. Este caso alertou para o fato de que os métodos de análise existentes nas principais farmacopeias do mundo não conseguiam detectar a presença destes contaminantes.

Na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira, o ensaio de identificação utilizando a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, capaz de identificar contaminantes como o sulfato de dermatan, foi adicionado às monografias das matérias-primas das heparinas cálcica e sódica. Além disso, também foram adicionados os ensaios de atividade anti-Fator IIa e o ensaio de atividade anticoagulante, para a determinação da potência.

Em 2016 foi aprovado o Primeiro Suplemento da Farmacopeia Brasileira da 5ª edição. Entre as mudanças ocorridas neste Suplemento, destaca-se que os insumos farmacêuticos, os medicamentos e outros produtos sujeitos à vigilância sanitária devem atender às normas e especificações estabelecidas na Farmacopeia Brasileira. Neste suplemento foram novamente incluídos a monografia da solução injetável da heparina sódica e cálcica, que haviam sido retiradas na 5ª edição, além disso, as monografias das heparinas de baixo peso molecular, matéria-prima e solução injetável foram adicionadas. Em relação ao doseamento, apenas o ensaio de atividade anti-FIIa foi mantido na monografia da heparina sódica, já para as heparinas de baixo peso molecular, os ensaios previstos são o de atividade anti-FXa e atividade anti-FIIa, com valores específicos para os diferentes tipos de heparina de baixo peso molecular: enoxaparina, tinzaparina, dalteparina e nadroparina. Os testes de identificação encontram-se somente na monografia da matéria-prima da heparina de baixo peso molecular.

Em relação a heparina de origem bovina, não existe, até o presente momento, monografia específica na Farmacopeia brasileira.

De acordo com a ANVISA, na ausência de monografia oficial de matéria-prima, formas farmacêuticas, correlatos e métodos gerais na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, e seu suplemento, para o controle de insumos e produtos farmacêuticos, poderá ser adotada monografia oficial, em sua última edição, de compêndios internacionais (FARMACOPEIA, 2004, FARMACOPEIA, 2010, FARMACOPEIA 2016).

1.5.3 Papel do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde no controle de qualidade

Segundo a Lei 8080 de 1990, que dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, é

incluída no campo de atuação do Sistema Único de Saúde (SUS) a Vigilância Sanitária. Entende-se por vigilância sanitária um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo: o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo; e o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde.

Uma das unidades da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), possui atuação direta em vigilância sanitária por ser referência nacional para as questões analítico-laboratoriais relativas ao controle da qualidade de alimentos, medicamentos, cosméticos, artigos e insumos para diálise e de saúde, reagentes e insumos diagnósticos, saneantes domissanitários, sangue e hemoderivados, saúde ambiental e medicamentos biológicos. Além disso, age em estreita cooperação com a ANVISA, com Secretarias estaduais e municipais de Saúde, entre outros parceiros (SETA, PEPE, OLIVEIRA, 2008).

A ANVISA tem por finalidade institucional promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e de fronteiras. A ANVISA foi instituída pela Lei 9782/99, Lei que também define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária.

O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) compreende o conjunto de ações de vigilância sanitária executado por instituições da Administração Pública direta e indireta da União, dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios, que exerçam atividades de regulação, normatização, controle e fiscalização na área de vigilância sanitária (COSTA, 2009).

Para o cumprimento de seu papel no âmbito do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, o INCQS realiza as análises laboratoriais previstas na legislação sanitária, somente para o poder público, seja por denúncia ou por programas em parceria com instituições do SNVS.

As modalidades de análises realizadas pelo INCQS incluem: análise prévia, análise fiscal e análise de controle. Para os medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos e saneantes, a análise prévia é efetuada sob o regime de Vigilância Sanitária, a fim de ser verificado se os mesmos podem ser objeto de registro. Para alimentos, a análise prévia encontra-se contemplada no registro de aditivos intencionais, de embalagens, equipamentos e

utensílios elaborados e/ou revestidos internamente de substâncias resinosas e poliméricas e de coadjuvante da tecnologia da fabricação que tenha sido declarada obrigatória, será sempre precedido de análise prévia.

A análise fiscal de alimentos é efetuada sobre o alimento apreendido pela autoridade fiscalizadora competente e que servirá para verificar a sua conformidade. Para drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos, cosméticos, produtos de higiene, produtos para saúde, perfumes, saneantes domissanitários, a análise fiscal é efetuada sobre os produtos, em caráter de rotina, para apuração de infração ou verificação de ocorrência de desvio quanto à qualidade, segurança e eficácia dos produtos ou matérias-primas.

A análise de controle é efetuada em produtos sob o regime de Vigilância Sanitária, após sua entrega ao consumo e destinada a comprovar a conformidade do produto com a fórmula que deu origem ao registro.

Em 2012, a ANVISA e o INCQS firmaram um termo de cooperação para análise de amostras de heparina, nas formas de insumo farmacêutico ativo e produto acabado. O monitoramento desse produto se deve principalmente a ocorrência dos relatos nacionais e internacionais sobre sua inefetividade. O INCQS foi considerado apto pela ANVISA para realizar todas as análises pertinentes a esse produto, e esta ficará ainda responsável pelo acompanhamento das atividades previstas pelo termo de cooperação. Um dos ensaios previsto nesse termo é o ensaio de potência, realizado através dos ensaios de atividade anti-Fator Xa e de atividade anti-Fator IIa, e o ensaio de coagulação; que deverá ser realizado pelo laboratório de Fisiologia, localizada no departamento de Farmacologia e Toxicologia/INCQS.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o controle de qualidade das heparinas sódicas não fracionadas de origem suína, comercializadas no Brasil, e de matéria prima em base seca, de origem suína e bovina, através dos ensaios cromogênicos de potência conforme disposto na trigésima nona edição da Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopeia - USP*), e compará-lo ao ensaio de coagulação, disposto na quinta edição da Farmacopeia Brasileira, utilizando como referência, o 6º Padrão Internacional de Heparina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Realizar o ensaio cromogênico de atividade anti-Fator Xa, no qual se determina a potência estimada da amostra de heparina em relação ao Padrão, através da capacidade da heparina em potencializar a antitrombina, inibindo o Fator Xa.

2 – Realizar o ensaio cromogênico de atividade anti-Fator IIa, no qual se determina a potência estimada da amostra de heparina em relação ao Padrão, através da capacidade da heparina em potencializar a antitrombina, inibindo o Fator IIa (trombina).

3 – Realizar o ensaio de coagulação, no qual se determina a potência estimada da amostra de heparina, através da atividade anticoagulante, ao se comparar sua habilidade em condições específicas para retardar a coagulação de um plasma ovino de referência, citratado e recalificado com a mesma capacidade do Padrão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

As 70 amostras utilizadas neste trabalho foram recebidas pelo laboratório de Fisiologia, do Departamento de Farmacologia e Toxicologia, INCQS/Fiocruz, no período de 13 de fevereiro de 2014 a 23 de março de 2016, sendo 64 amostras na forma farmacêutica de solução injetável em apresentação de frasco-ampola de 5.000 UI/ml e ampola de 5.000 UI/0,25ml, pertencentes a duas marcas nacionais, e 6 amostras de matéria-prima em base seca.

3.2 ENSAIOS CROMOGÊNICOS DE ATIVIDADE ANTI-FXA E ATIVIDADE ANTI-FIIA

3.2.1 Preparo da amostra

3.2.1.1 *Produto acabado*

As amostras foram diluídas com tampão-TRIS pH 8,4 (0,050M Tris, 0,0075M EDTA, 0,175M NaCl, PEG 6000 1%) a fim de obter uma concentração de 20UI/ml, posteriormente diluídas para a concentração de 2UI/ml e por fim, para as concentrações utilizadas nos ensaios.

3.2.1.2 *Matéria-prima*

Aproximadamente 1mg da matéria-prima foi pesado em balança digital de precisão, com cinco casas decimais, e em seguida reconstituído em 1 ml água deionizada, estimando como concentração 180UI/mg. As amostras foram diluídas com tampão-TRIS pH 8,4 (0,050M Tris, 0,0075M EDTA, 0,175M NaCl, PEG 6000 1%) a fim de obter uma concentração de 20UI/ml, posteriormente diluídas para a concentração de 2UI/ml e por fim, para as concentrações utilizadas nos ensaios.

3.2.2 Preparo do Padrão

Foi utilizado o 6º Padrão Internacional de Heparina não fracionada, contendo alíquotas de heparina liofilizada preparado a partir de mucosa de suínos, codificado por 07/328. Esta preparação foi estabelecida pelo perito da Comissão de Normalização Biológica da Organização Mundial da Saúde em 2009, com potência de 2.145 UI /ampola.

Para o preparo do padrão, uma ampola foi resconstituída em 100 ml de água deionizada, e alíquotadas em eppendorfs com 1 ml, com concentração final de 21,45 UI/ml. Para a realização do ensaio, as alíquotas foram diluídas em tampão-TRIS pH 8,4 (0,050M Tris, 0,0075M EDTA, 0,175M NaCl, PEG 6000 1%) para a concentração de 2UI/ml e posteriormente para as concentrações utilizadas nos ensaios.

3.2.3 Ensaio de atividade anti-FXa

O ensaio de atividade anti-FXa foi realizado adicionando em microplaca de 96 poços, previamente aquecida a 37 ° C por 15 minutos em incubadora de microplaca (Thermo Shaker – Agimaxx), 30µl de quatro concentrações do 6º padrão Internacional de Heparina (0,02; 0,04; 0,07 e 0,1 UI/ml, selecionadas com base na região linear) e 30µl da amostra nas mesmas concentrações, em duplicata, com o objetivo de estabelecer uma curva dose-resposta. Padrão e amostra foram incubados e agitados por 2 minutos à 37° C com 30µl de antitrombina 1 UI/ml (Anti-thrombin III 1,5 mg – HYPHEN BioMed), para que ocorresse a ligação da heparina à antitrombina. Após incubação, foi adicionado 60µl de FXa 10 nKat (Bovine Factor Xa - HYPHEN BioMed), incubado e agitado por mais 2 minutos. Por fim, 60µl do substrato cromogênico 1,30 mM (S-2222 25 mg – Chromogenix), específico para o FXa foi adicionado, incubado e agitado por mais 5 minutos. A reação foi interrompida com 30 µl de ácido acético 20%. A absorbância foi lida em leitor de microplaca (BioTek-Epoch) em endpoint a 405 nm.

3.2.4 Ensaio de atividade anti-FIIa

O ensaio de atividade anti-FIIa foi realizado adicionando em microplaca de 96 poços, previamente aquecida a 37 ° C por 15 minutos em incubadora de microplaca (Thermo Shaker – Agimaxx), 50µl de quatro concentrações do 6º padrão Internacional de Heparina (0,003; 0,005; 0,01 e 0,02 UI/ml, selecionadas com base na região linear) e 50µl da amostra nas mesmas concentrações, em duplicata, com o objetivo de estabelecer uma curva dose-resposta. Amostra e Padrão foram incubados e agitados por 2 minutos à 37° C com 100µl de antitrombina 0,125 UI/ml (Anti-thrombin III 1,5 mg – HYPHEN BioMed), para que ocorresse a ligação da heparina à antitrombina. Após incubação, foi adicionado 25µl de trombina 5UI/ml (Thrombin – Sigma Aldrich), incubado e agitado por mais 2 minutos. Por fim, 50µl do substrato cromogênico 1,25 mM (S-2238 25mg – Chromogenix), específico para a trombina foi adicionado, incubado e agitado por mais 5 minutos. A reação foi interrompida com 5µl de ácido acético 20%. A absorbância foi lida em leitor de microplaca (BioTek-Epoch) em endpoint a 405 nm.

3.2.5 Análise estatística

Foram utilizados para análise, os modelos estatísticos *Slope ratio* (inclinação das retas) ou Linhas paralelas, dependendo do melhor modelo que descrevesse a correlação entre a concentração e a resposta. O laboratório de Fisiologia utiliza um pacote estatístico validado, o Combistats™ para a realização dos cálculos. Foram analisadas a linearidade, o paralelismo - no caso do modelo de Linhas Paralelas - , e a regressão. Os ensaios foram considerados válidos quando Linearidade e Paralelismo apresentaram $p > 0,05$, e a regressão $p < 0,05$.

A potência estimada para produtos acabados em cada ensaio deve ser de não menos de 90% e não mais de 110% da potência declarada. A potência para matéria-prima deve ser não menos de 180 UI/mg em cada ensaio. Os limites de confiança da potência estimada devem ser não inferiores a 80% e não superiores a 125% da potência declarada ($P=0,95$).

O critério de aceitação para as amostras é que a razão da atividade anti-Fator Xa pela atividade anti-Fator IIa deve estar compreendida entre 0,9 e 1,1.

3.3 ENSAIO DE COAGULAÇÃO

3.3.1 Preparo da amostra

3.3.1.1 *Produto acabado*

As amostras foram diluídas em solução salina (0,9% NaCl) a fim de obter uma concentração de 20UI/ml, e posteriormente diluídas nas concentrações de 0,8, 0,92 e 1,05 UI/ml, selecionadas com base na região linear.

3.3.1.2 *Matéria-prima*

Aproximadamente 1mg da matéria-prima foi pesado em balança digital de precisão, com cinco casas decimais, e em seguida reconstituído em 1 ml água deionizada, estimando como concentração 180UI/mg. As amostras foram diluídas com em solução salina (0,9% NaCl) a fim de obter uma concentração de 20UI/ml, e posteriormente nas concentrações de 0,8, 0,92 e 1,05 UI/ml.

3.3.2 Preparo do Padrão

Foi utilizado o 6º Padrão Internacional de Heparina não fracionada, contendo alíquotas de heparina liofilizada preparado a partir de mucosa de suínos, codificado por 07/328. Para a realização do ensaio, as alíquotas (21,45 UI/ml) foram diluídas em solução salina (0,9% NaCl) para as concentração de 0,8, 0,92 e 1,05 UI/ml.

3.3.3 Procedimento do ensaio de coagulação

O método utilizado foi o Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPa), utilizando coagulômetro (Stago START) para incubação a 37°C e contagem do tempo. Para cada ensaio foram adicionados 50µl de plasma ovino e 50µl de heparina, padrão ou amostra, agitados cuidadosamente e incubados por 800 segundos, em seguida foi adicionado 50 µl de cefalina (C.K. PREST® - Stago) e incubado por mais 2 minutos, por fim 50µl de cloreto de cálcio 0,025M (Stago) foi adicionado, e o tempo necessário para a coagulação monitorado. O tempo de recalcificação do branco foi feito no início e final do procedimento, adicionando solução salina (0,9% NaCl) no lugar das diluições de heparina. Foram realizados três ensaios independentes, sendo cada um em duplicata.

3.3.4 Análise estatística

Os três ensaios realizados para cada amostra foram calculados separadamente, utilizando o modelo estatístico de Linhas Paralelas e depois combinados, utilizando o pacote estatístico validado Combistats™. Foram analisadas a linearidade e a regressão. Os ensaios foram considerados válidos quando Linearidade e Paralelismo apresentaram $p > 0,05$, e a regressão $p < 0,05$.

A potência estimada para produtos acabados em cada ensaio deve ser de não menos de 90% e não mais de 110% da potência declarada. A potência para matéria-prima deve ser não menos de 180 UI/mg. Os limites de confiança da potência estimada devem ser não inferiores a 80% e não superiores a 125% da potência declarada ($P=0,95$).

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DAS AMOSTRAS DE HEPARINA SÓDICA NÃO FRACIONADA

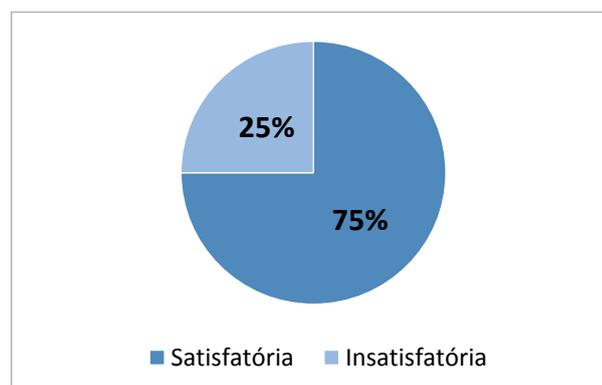
4.1.1 Ensaios cromogênicos de atividade anti-FXa e anti-FIIa

A determinação da potência, através dos ensaios cromogênicos de atividade anti-FIIa e atividade anti-FXa, para as 64 amostras de heparina sódica não fracionada, demonstrou que 48 amostras foram consideradas satisfatórias, ou seja, foram aprovadas individualmente em cada um dos ensaios, com limite de potência entre 90 a 110%, e apresentaram razão entre atividade anti-FXa/anti-FII entre 0,9 e 1,1. Outras 16 amostras foram consideradas insatisfatórias por terem pelo menos um dos ensaios reprovados (Gráfico 1).

A média da potência estimada das amostras aprovadas no ensaio de atividade anti-FXa foi de 102,48% e de 101,94% para o ensaio de atividade anti-FIIa. No ensaio de atividade anti-FXa, 66,67 % dessas amostras obtiveram mais de 100% de potência, e 58,34% obtiveram mais de 100% de potência no ensaio de atividade anti-FIIa, quando comparadas ao padrão. A média das amostras reprovadas no ensaio de atividade anti-FXa foi de 117,92% e de 127,34% no ensaio anti-FIIa.

Das amostras insatisfatórias, nove foram reprovadas nos dois ensaios, com potência superior a 110%; seis com potência superior a 110 % no ensaio de atividade anti-FIIa e apenas uma com potência inferior a 90% no ensaio de atividade anti-FIIa.

Gráfico 1: Total de amostras (64) de heparina sódica não fracionada, analisadas por ensaio de atividade anti-FXa e atividade anti-FIIa



Quando comparamos as amostras por marca, aqui chamadas de marca A e marca B, observamos uma superioridade de qualidade de uma frente à outra. Das 64 amostras analisadas, 39 pertencem a marca A, sendo 24 satisfatórias e 15 insatisfatórias, 25 amostras pertencem a marca B, sendo 24 satisfatórias e 1 insatisfatória (Gráfico 2).

Gráfico 2: Amostras de heparina sódica não fracionada, analisadas por ensaio de atividade anti-FXa e atividade anti-FIIa, separadas por marca A (total de 39 amostras) e marca B (total de 25 amostras).

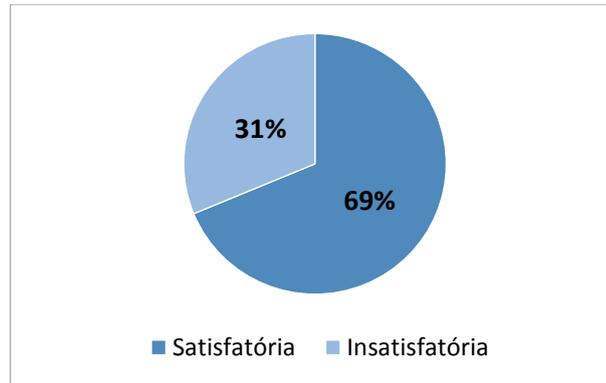


4.1.2 Ensaio de coagulação

A determinação da potência através do ensaio de coagulação demonstrou que, das 64 amostras analisadas anteriormente pelos ensaios cromogênicos, 44 foram consideradas satisfatórias, ou seja, apresentaram potência entre 90 e 110%, as outras 20 amostras foram consideradas insatisfatórias (Gráfico 3).

A média das amostras satisfatórias foi de 104,8% e das insatisfatórias de 114,9%. Das amostras satisfatórias, 90,9% apresentaram potência superior a 100%, e dentre as insatisfatórias, todas foram reprovadas por apresentarem potência superior a 110%.

Gráfico 3: Total de amostras (64) de heparina sódica não fracionada, analisadas por ensaio de coagulação



Quando comparamos as marcas A e B, observamos que neste ensaio, a Marca A teve 20, das 39 amostras insatisfatórias, enquanto que a Marca B teve todas as 25 amostras satisfatórias (Gráfico 4).

Gráfico 4: Amostras de heparina sódica não fracionada, analisadas por ensaio de coagulação e separadas por marca A (total de 39 amostras) e marca B (total de 25 amostras).



Dentre as 20 amostras insatisfatórias no ensaio de coagulação, oito também foram reprovadas nos dois ensaios cromogênicos de atividade anti-FXa e anti-FIIa, quatro também foram reprovadas no ensaio de atividade anti-FIIa e oito foram reprovadas apenas no ensaio de coagulação.

Além dessas 20 amostras, 1 outra amostra foi reprovada somente nos dois ensaios cromogênicos, e outras três foram reprovadas somente no ensaio de atividade anti-FIIa, sendo assim, 24 das 64 amostras analisadas tiveram pelo menos um dos ensaios (atividade anti-FXa, atividade anti-FIIa ou ensaio de coagulação) reprovados (Tabela 1).

Tabela 1: Total de amostras insatisfatórias (24) divididas por ensaio

Ensaio	Amostras insatisfatórias				
	8	4	8	1	3
Atividade anti-FXa	X			X	
Atividade anti-FIIa	X	X		X	X
Coagulação	X	X	X		

4.2 DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DAS AMOSTRAS DE MATÉRIAS-PRIMAS

4.2.1 Ensaio cromogênicos de atividade anti-FXa e anti-FIIa

Foram analisadas seis amostras de matéria-prima, sendo três de origem de intestino suíno e três de origem de intestino bovino. Todas as três amostras de origem suína apresentaram no mínimo 180 UI/mg em ambos os ensaios, e razão entre atividade anti-FXa/anti-FIIa entre 0,9 e 1,1, sendo consideradas satisfatórias. As amostras de origem bovina apresentaram potência inferior a 180 UI/mg nos dois ensaios, no entanto, não podem ser consideradas insatisfatórias uma vez que ainda não apresentam monografia própria, não havendo, portanto, limite de potência, e além disso, o ensaio foi realizado utilizando padrão de Heparina de origem suína e não bovina (Tabela 2).

Tabela 2: Resultado dos ensaios de atividade anti-FXa e anti-FIIa para matéria-prima

Matéria-prima		Atividade anti-FXa (UI/mg)	Atividade anti-FIIa (UI/mg)	Razão atividade anti-FXa/ anti-FIIa
Origem suína	1	193,157	193,651	0,997
	2	181,886	182,325	0,998
	3	184,043	191,201	0,963
Origem bovina	1	107,795	169,427	0,636
	2	85,32	81,088	1,052
	3	140,488	137,928	1,018

4.2.2 Ensaio de coagulação

As três amostras de matéria-prima de origem suína também apresentaram potência de no mínimo 180 UI/mg nos ensaios de coagulação. As matérias-primas de origem bovina apresentaram potência entre 119 e 169 UI/mg (Tabela 3).

Tabela 3: Resultado dos ensaios de coagulação para matéria-prima

Matéria-prima		Potência (UI/mg)
Origem suína	1	197,538
	2	186,908
	3	204,701
Origem bovina	1	169,66
	2	119,755
	3	165,186

5 DISCUSSÃO

5.1 Potências obtidas nas amostras de heparina sódica não fracionada

Nosso trabalho demonstrou que 24 das 64 amostras analisadas de heparina sódica não fracionada, tiveram pelo menos um dos ensaios reprovados, totalizando 37,5% de amostras insatisfatórias. Sendo assim, considerável parte das amostras não está conforme a monografia da heparina sódica não fracionada da 39ª edição da USP, para os ensaios cromogênicos, e da 4ª edição da Farmacopeia brasileira, para o ensaio de coagulação, representando um risco potencial aos pacientes que fazem uso deste medicamento.

Em relação às duas marcas, observamos uma superioridade de qualidade da marca B em relação à marca A uma vez que, apenas uma das 25 amostras da marca B foi reprovada. Além disso, essa reprovação se deu somente no ensaio de atividade anti-FIIa, com potência de 113,8% da potência declarada, os demais ensaios, atividade anti-FXa e coagulação, obtiveram 100,0 e 108,5% de potência, respectivamente. Sendo assim, tal reprovação pode ter ocorrido por eventual falha técnica, levando em consideração os resultados satisfatórios dessa mesma amostra nos outros ensaios, e das demais amostras dessa marca em todos os três ensaios. Pode também ter ocorrido falha em outras três amostras da Marca A, que tiveram somente o ensaio de atividade anti-FIIa reprovados.

Notamos também que quase todas as amostras insatisfatórias, com exceção de uma, que obteve menos de 90% de potência no ensaio de atividade anti-FIIa, obtiveram mais de 110% de potência, em pelo menos um dos ensaios, tanto os cromogênicos, quanto o de coagulação.

Estima-se que 5 a 10% dos pacientes que usam heparina não fracionada apresentam algum tipo de sangramento, como hematúria, hemorragia digestiva alta, hemoptise, epistaxe, equimose, melenas e hematomas. Eventos hemorrágicos, como complicações do uso da infusão contínua de heparina sódica são preocupantes, pois em função do local ou órgão afetado e do volume de sangue comprometido pode aumentar a instabilidade hemodinâmica, a ventilatória, aumentar a mortalidade, o tempo de internação, além de requerer medidas de intervenção (CAMERINI, SILVA, 2014). Sendo assim, heparinas que apresentem potência superior ao permitido podem potencializar esses efeitos, principalmente quando se trata dos grupos de risco, que incluem idosos, pacientes que apresentam de hipertensão arterial ou insuficiência renal.

A heparina, que já é um medicamento potencialmente perigoso, e que apresenta risco aumentado de provocar danos significativos aos pacientes em decorrência de falha no processo

de utilização, deve ser utilizada com muito cuidado e atenção pelos profissionais de saúde. O monitoramento laboratorial através do ensaio de TTPa, que já é utilizado na prática clínica, torna-se indispensável para avaliar a resposta terapêutica à heparina, que varia de indivíduo para indivíduo, e além disso, pode ajudar na detecção de alterações causadas por eventuais falhas de qualidade, garantindo sua efetividade e segurança.

5.2 Potências obtidas nas amostras de matérias-primas

A análise das matérias-primas demonstrou que todas as amostras de heparina não fracionada de origem suína, apresentam-se satisfatórias, ou seja, obtiveram no mínimo 180 UI/mg medido em base seca. Além disso, os resultados obtidos nos três ensaios foram em pelo menos duas amostras, bem consistentes.

Em relação às de origem bovina, podemos observar que de fato, apresentam menor potência do que a de origem suína, como demonstrado na literatura (GOMES, BRAILE, 2009. JUNQUEIRA, et al., 2011), no entanto, a potência obtida pode não corresponder ao valor real, uma vez que, para a realização dos ensaios, o padrão utilizado foi o 6º Padrão Internacional da heparina não fracionada, de origem suína. Além disso, ainda não existe monografia específica para as heparinas de origem de intestino bovino, dessa forma, não podemos classificá-las como satisfatória ou insatisfatória.

As heparinas de intestino bovino apesar de terem frações muito semelhantes com as de intestino suíno, diferem na proporção destas, sendo, portanto, significativamente diferentes em sua composição, além disso, apresentam grande heterogeneidade estrutural. Sendo assim, apresentam diferenças na atividade anticoagulante, trombose e sangramento e, além disso, também difere em sua afinidade pela protamina, substância utilizada na inibição do efeito anticoagulante do fármaco (ANJOS et al., 2012, GOMES, BRAILE, 2009, JUNQUEIRA, et al., 2011. TOVAR et al., 2012).

Dessa forma, o fato de atualmente só existir heparina injetável de origem suína, aumenta a garantia de um melhor uso deste medicamento, uma vez que, não existem problemas na troca de um produto pelo outro, pois não existe intercambialidade entre elas, são também mais toleráveis e possuem melhor qualidade de matéria-prima, sem o risco de contaminação por príons causadores da encefalopatia espongiiforme.

5.3 Ensaio cromogênicos *versus* ensaio de coagulação

Os métodos de ensaio para a determinação da potência, em amostras de heparina, devem ser precisos e devem refletir o modo da sua ação anticoagulante e não serem facilmente influenciados pela presença de impurezas ou contaminantes.

O ensaio de coagulação utiliza a formação de fibrina como ponto final e, portanto, pode ser facilmente influenciado pela qualidade do sangue ou plasma, impurezas e contaminantes, como no caso da contaminação com sulfato de condroitina supersulfatada, que leva a um aumento da atividade anticoagulante da heparina.

Além disso, plasmas ovinos de diferentes produtores têm quantidades variáveis de Fator Plaquetário 4 (FP4), uma proteína encontrada nos grânulos alfa das plaquetas, que pode neutralizar a atividade anticoagulante de preparações de heparina. Sabe-se também, que a neutralização da heparina por FP4, é dependente do peso molecular e que amostras de maior peso molecular são mais facilmente neutralizáveis do que as frações de baixo peso molecular. Assim, se a amostra de teste de heparina tiver um perfil de peso molecular significativamente diferente do padrão de referência, a potência obtida utilizando os métodos de coagulação pode ser sub ou superestimada (LEVER, MULLOY, PAGE, 2013. LEVINE et al., 1984).

Os ensaios cromogênicos utilizam proteínas e reagentes purificados, com ausência de FP4 e outras proteínas plasmáticas interferentes. Ambos os ensaios cromogênicos são altamente específicos para as heparinas, uma vez que se baseiam no princípio de que apenas as preparações de heparina têm a sequência pentassacarídica específica, pré-requisito para a ligação da heparina à antitrombina, e conseqüentemente inibição da trombina e do FXa (LEVER, MULLOY, PAGE, 2013).

Sendo assim, a substituição gradativa do teste de coagulação pelos ensaios cromogênicos em virtude do surto registrado entre 2008 e 2009, causado pela contaminação da matéria-prima de origem chinesa por sulfato de condroitina supersulfatada, foi de grande importância no que diz respeito ao controle de qualidade das heparinas. Os testes cromogênicos garantem resultados mais precisos e estabelecem a melhor relação da potência estimada, uma vez que não sofrem interferências de contaminantes, além disso, apesar de serem mais caros, são também mais rápidos.

Em relação aos valores obtidos nos ensaios de potência, observamos que oito amostras de heparina sódica não fracionada, foram reprovadas somente no ensaio de coagulação, apresentando valores aproximadamente de 2 a 20% (média de 10,60%) maiores do que os

obtidos nas mesmas amostras, nos ensaios cromogênicos. Não se pode afirmar que essas amostras possuam algum tipo de contaminante, no entanto, tais resultados sugerem que existe algum tipo de interferente que pode ter contribuído para o aumento da atividade anticoagulante. Além disso, diferenças nos pesos moleculares das amostras e padrão também podem ter contribuído para a reprovação das amostras no ensaio de coagulação e aprovação das mesmas nos ensaios cromogênicos.

Estudos vêm demonstrando que, preparações de heparina não fracionada com peso molecular menor ao padrão, apresentam diferenças nas potências obtidas entre os ensaios de coagulação e o ensaio de atividade anti-FIIa. As potências obtidas com o ensaio de coagulação, utilizando plasma ovino, foram superiores às potências obtidas no ensaio de atividade anti-FIIa (LEVER, MULLOY, PAGE, 2013). Além disso, essas preparações com peso molecular menor, não possuem a mesma ação anticoagulante de preparações com peso molecular próximo ao padrão, elas apresentam atividade anticoagulante menor, demonstrado por ensaio de coagulação. Se as amostras tiverem as mesmas propriedades que o padrão de referência, serão obtidas estimativas de potência semelhantes independentemente dos métodos de ensaio utilizados (MELO et al., 2008).

Outro ponto a ser discutido foram os diferentes valores obtidos no ensaio de coagulação e no ensaio de atividade anti-FXa. A literatura (GREY et al., 1995. THOMAS, CURTIS, BARROWCLIFFE, 1984. VACCARI et al., 2003) registra diferenças inferiores a 3,5% entre o ensaio de coagulação, utilizando o método do TTPA e o ensaio de atividade anti-FXa. No entanto, a diferença entre as potências encontradas entre esses dois ensaios foi de 5,44%, demonstrando que os dados registrados na literatura, não foram reprodutíveis neste trabalho. Diferenças nos pesos moleculares entre amostra e padrão, poderiam justificar 76,56% das amostras, uma vez que apresentaram potências maiores no ensaio de coagulação. Embora os dados anteriormente apresentados em relação ao peso molecular, sejam referentes ao ensaio de atividade anti-FIIa, sabe-se que a proporção da atividade anti-FXa e anti-FIIa é de 1:1, podendo-se então sugerir tal associação.

Dessa forma, ensaios de identificação utilizando como, por exemplo, a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, capazes de detectar contaminantes e o ensaio de cromatografia de filtração em gel para determinação da distribuição de peso molecular, poderiam elucidar o fato das oito amostras terem sido reprovadas somente no ensaio de coagulação, e as diferenças obtidas entre os ensaios de coagulação e os cromogênicos.

6 CONCLUSÃO

O surto causado entre 2008 e 2009 devido à má qualidade das preparações de heparina e as mudanças ocorridas em suas monografias em decorrência deste fato, permitiram um melhor controle de qualidade deste produto em virtude dos novos métodos de análise. A introdução dos métodos cromogênicos em substituição ao ensaio de coagulação permitiu a obtenção de resultados mais precisos, uma vez que são ensaios mais específicos e, além disso, não sofrem interferências de contaminantes.

O monitoramento da qualidade das heparinas é de grande importância para a vigilância sanitária, além de verificar sua conformidade com as normas vigentes, também podem direcionar ações estratégicas da ANVISA em relação a este produto.

Neste trabalho pudemos ter um panorama geral da qualidade das heparinas sódicas não fracionadas comercializadas no Brasil, através dos ensaios de potência. De um modo geral, a maioria das amostras apresentou-se dentro do exigido pelas Farmacopeias, no entanto, as amostras insatisfatórias que apresentaram potência superior a 110%, podem representar risco de sangramento para os pacientes, além de potencializar outros riscos, como por exemplo, a trombocitopenia induzida por heparina. Dessa forma, torna-se necessário o monitoramento contínuo das heparinas, a fim de diminuir os riscos inerentes ao seu uso, salvaguardando a saúde pública.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Banco de dados de produtos registrados das empresas de medicamentos e hemoderivados.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Disponível em:
http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_medicamento.asp

AMORIM, S.R., KLIER, A.H., AGELIS, L.H. **Controle de qualidade na indústria farmacêutica: identificação de substâncias por espectroscopia no infravermelho. Quality control in the pharmaceutical industry: Identification of infrared spectroscopy.** Rev. Bras. Farm. v.94, n.3, p.234-242. 2013

ANJOS, D. P., SILVA, A. V. P., SILVA, S. A., MOURA, W. C., ALMEIDA, A., E., C., C. **Avaliação comparativa da atividade biológica de heparinas não fracionadas pelas metodologias de inibição da coagulação do plasma ovino (ICPO) e de tempo de tromboplastina parcial ativada (TPPA).** Rev. Inst. Adolfo Lutz. v.71, n.3, p.566-72. 2012.

BLOSSON, D. B. et al. **Outbreak of Adverse Reactions Associated with Contaminated Heparin.** The new england journal of medicine. v. 25, p.359. 2008.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. **Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências.** Diário Oficial da república Federativa do Brasil. Brasília, 19 de setembro de 1990.

BRASIL. Lei nº. 9.782, de 26 de janeiro de 1999. **Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 27 de janeiro de 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17 de 16 de abril de 2010: **Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.** Diário Oficial da União. 19 abril 2010.

BRUNTON, L.L, CHABNER, B. A., KNOLL, B. C. Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** São Paulo. AMGH. 12ed. 2012.

CAMERINI, F.G., LOLITA, D. S. **Características dos pacientes que receberam heparina sódica: fundamentando um cuidado de enfermagem seguro. Characteristics of patients receiving heparin: grounds for safe care nursing. Características de los pacientes que recibieron heparina sódica: basando un cuidado de enfermería seguro.** Rev enferm UERJ, Rio de Janeiro. V. 22, n.2, p.175-81. 2014.

- COSTA, E. A. **Vigilância Sanitária: temas para debate**. Salvador: EDUFBA. p. 237. 2009.
- FARMACOPEIA Brasileira. 4 ed. Brasília: ANVISA, 2004.
- FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília: ANVISA, 2010.
- FARMACOPEIA Brasileira. Primeiro Suplemento. Brasília: ANVISA, 2016.
- FILHO, C. C., CHAMONE, D. A. F., RACHED, R. A. MAFFEI, F. H. **Heparinas - momento atual**. Rev Assoc Med Bras.; v. 54, n.6, p.471-86. 2008.
- FILHO, N. A. **Desafios na qualidade de heparinas - Challenges in the quality of heparin**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. v. 31. n.5. p. 306-307. 2009.
- GEHRIE, E. LAPOSATA, M. **Test of the Month: The chromogenic antifactor Xa assay**. American Journal of Hematology. v. 87, p.194–196, 2012.
- GOLAN et al. **Princípios de Farmacologia. A base fisiopatológica da farmacologia**. Grupo editorial Nacional. 3 ed. 2014
- GOMES, W. J, BRAILE, D. M. **A busca de soluções para o problema das heparinas no mercado nacional**. Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva. v. 17. f. 2. 2009.
- GRAY, E., HEATH, A.B., MULLOY, B., SPIESER, J.M., BARROWCLIFE, T.W. **A collaborative study of proposed european pharmacopoeia reference preparations of low molecular mass heparins**. Thromb Haemost. v.74, p.893-9. 1995
- HAMERSCHLAK, N., ROSENFELD, L.G.M. Utilização da Heparina e dos Anticoagulantes Orais na Prevenção e Tratamento da Trombose Venosa Profunda e da Embolia Pulmonar. Arq Bras Cardiol. v.67, n. 3. 1996
- HOFFMAN, M.; MONROE, D.M. **A cell-based model of hemostasis**. Thromb Haemost.; v.85, n.6, p. 958-965, 2001.
- HIRSH, J., ANAND S.S., HALPERIN, J.L, FUSTER, V. **Mechanism of Action and Pharmacology of Unfractionated Heparin**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. v.21, p.1094

1096. 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS) disponível em: <http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/instituto-nacional-de-controle-de-qualidade-em-sa%C3%BAde-incqs>.

INSTITUTO PARA PRÁTICAS SEGURAS NO USO DE MEDICAMENTOS (ISMP - Brasil). **Heparina: erros de medicação, riscos e práticas seguras na utilização.** v.2, n.5. 2013.

JUNQUEIRA, D. R. G. et al. **Farmacovigilância da heparina no Brasil.** Rev Assoc Med Bras; v. 57, n.3, p.328-332. 2011.

KATKUNG, B.G., MASTERS, S.B., TREVOR, A.J. **Farmacologia Básica e Clínica.** AMGH Editora Ltda. Porto Alegre. 12ed. 2014.

LEVER, R., MULLOY, B., PAGE, C.P. **Heparin - A Century of Progress.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2012.

LEVINE, S.P., SORENSON, R.R. HARRIS, M.A., KNIERIEM, L.K. **The effect of platelet factor 4 (PF4) on assays of plasma heparin.** British Journal of Haematology. v.57,p. 585-596. 1984

LONGHI, F.; LAKS, D.; KALIL, N. G. N.. **Trombocitopenia induzida por heparina.** Rev. Bras. Hematol. Hemoter., São José do Rio Preto , v. 23, n. 2, p. 93-99. 2001.

MEIS, E., LEVY, R. A. **Câncer e trombose: uma revisão da literatura. Cancer and thrombosis: a literature review.** Revista Brasileira de Cancerologia; v.53, n.2, p. 183-193. 2007.

MELO, E. I. et al. **Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular Heparin quality control in the Brazilian market: implications in the cardiovascular surgery.** Rev Bras Cir Cardiovasc; v. 23, n., p.169-174.2008.

MONROE, D.M., HOFFMAN, M., ROBERTS, H.R. **Platelets and thrombin generation.** Arterioscler Thromb Vasc Biol.; v.22, n.9, p.1381-1389. 2002.

MULLOY, B., HOGWOOD, J., GRAY E., LEVER, R., PAGE, C., P. **Pharmacology of Heparin and Related Drugs.** Pharmacol Rev 68. 2016

PIMENTA, R.E.F et al. **Trombocitopenia induzida por heparina em paciente com oclusão arterial aguda. Heparin induced thrombocytopenia in a patient with acute arterial occlusion.** J Vasc Bras., v.15, n.2, p.138-141. 2016

RODRIGUES, E. S. et al. **Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia.** Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, v. 10, n. 1, p.218-233. 2012.

SETA, M., H., PEPE, V. L. E., OLIVEIRA, G., O. **Gestão e Vigilância Sanitária, modos atuais do pensar e fazer.** Rio de Janeiro. FIOCRUZ. 2008.

STAICO, R., et al. **Heparina Não-Fracionada e de Baixo Peso Molecular: Equivalência ou Superioridade na Intervenção Coronária Percutânea.** Rev Bras Cardiol Invas; 12(3): 138-145. 2004.

SMYTHE. M., A. **Changes in the USP Heparin Monograph and Implications for Clinicians.** Pharmacotherapy. v.30., n.5. 2010.

TOMAI, T. S., BERSUSA, A.A.S., LOUVISON, M.C.P., BONFIM, J.R.A. **Heparinas de baixo peso molecular para profilaxia de trombose venosa profunda na gravidez: parecer técnico-científico.** São Paulo: Instituto de Saúde, 2013

TOVAR, A.M. F, et al. **Heparin from bovine intestinal mucosa: Glycans with multiple sulfation patterns and anticoagulant effects.** Blood Coagulation. Fibrinolysis and Cellular Haemostasis. v. 107, n.5. 2012

THE UNITED STATE PHARMACOPEIA 39. National Formulary : 2016.

THOMAS, D.P., CURTIS, A.D., BARROWCLIFFE, T.W. **A collaborative study designed to establish the 4th International Standard for heparin.** Thromb Haemost . v. 52, p.148-53. 1984

VIEIRA, F.P., REDIGUIERI, C.F., REDIGUIERI, C.F. **Regulação de medicamentos no Brasil.** Porto Alegre: Artmed. p. 470. 2013

VACCARI, S., F. JÚNIOR, L. B. MASIERO, S. M. K. FRONZA, M. DALMORA, S. L. **Avaliação comparativa da atividade biológica de heparinas não-fracionadas em**

produtos farmacêuticos. Rev. bras. hematol. hemoter; v.25, n.2, p.103-110. 2003.