

Artigo

Avaliação da qualidade de heparinas não fracionadas por ensaios biológicos de potência

Rebeca Vieira*, Emily Santos, Gustavo Borges, Vanessa Pacheco, Ricardo Souto.

Laboratório de Ensaio Biológicos Farmacêuticos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

* Autor Correspondente: rebecca.sdv28@gmail.com

Resumo: A heparina é um medicamento biológico extraído e purificado da mucosa intestinal de suínos e bovinos e do pulmão de bovinos. Entre 2007 e 2008, eventos adversos em pacientes, como a ocorrência de discrasias sanguíneas e reações de caráter anafilactóide, foram relacionadas ao uso de lotes de heparinas não fracionadas. Tal fato provocou um alerta sanitário do mercado de heparinas de ordem mundial. O objetivo do trabalho foi realizar o controle de qualidade biológico de potência de heparinas não fracionadas. 10 amostras foram analisadas no total, sendo 7 de matéria-prima em base seca analisadas pelos métodos de Inibição da Coagulação do Plasma Ovino (ICPO), Atividade Anti-fator IIa, e Atividade Anti-fator Xa e 3 amostras de solução injetável, analisadas apenas pelo ensaio de ICPO. Todos os ensaios foram realizados pelo menos em duplicata. Apenas uma amostra de matéria-prima cumpriu o requisito farmacopeico de no mínimo 180 UI/mg da atividade anti-IIa. As amostras de produto acabado na forma de solução injetável cumpriram a especificação de potência que determina atividade entre 90 a 110% do valor declarado. Destaca-se que as matérias-primas analisadas estão em fase de desenvolvimento e estes ensaios são fundamentais para escolha de um insumo com adequada atividade/massa, visando à produção farmacêutica. A combinação e análise por diferentes ensaios de potência contribuem para avaliar com segurança a qualidade destes produtos biológicos. Tais resultados são importantes para assegurar e monitorar a qualidade dos produtos comercializados no país.

Palavras-chave: Plasma ovino; Anti-fator IIa; Anti-fator Xa.

Editores: Carlos Henrique Salvino
Gadelha Meneses e João Augusto
Oshiro Junior

Recebido: 01/10/2023
Revisado: 8/03/2024
Aceito: 01/08/2024
Publicado: 08/10/2024

Copyright: © 2023 by the authors.
Submitted for possible open access
publication under the terms and
conditions of the Creative Commons
Attribution (CC BY) license
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introdução

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) se constituem como um problema de saúde pública de grande magnitude. O processo de transição epidemiológica, observado no Brasil desde a década de 60, se configura por uma mudança no perfil etiológico das patologias, que passa de um perfil infecto-contagioso para doenças crônicas não-infecciosas. Dentre as DCNTs, as doenças do aparelho circulatório representam a causa mais prevalente de mortes [1].

A heparina tem indicação clínica tanto para profilaxia quanto para tratamento de Tromboembolismo Pulmonar (TEP) e Trombose Venosa Profunda (TVP). A anticoagulação por heparina é utilizada também durante procedimentos cirúrgicos, revestimento de dispositivos, hemodiálise e mais recentemente, teve seu uso associado à pacientes graves de COVID-19 [2-3].

A heparina é registrada como medicamento biológico e comercializada no Brasil sob os nomes comerciais de Hemofol® (Cristália), Hepamax-S® (Blau Farmacêutica), Parinex® (Hipolabor Farmacêutica) e Hemacin® (Insitituto Biochimico Indústria Farmacêutica). É extraída da mucosa intestinal de bovinos e suínos e do pulmão de bovinos e a obtenção de suas cadeias polissacarídicas está intimamente relacionada ao processo produtivo [4].

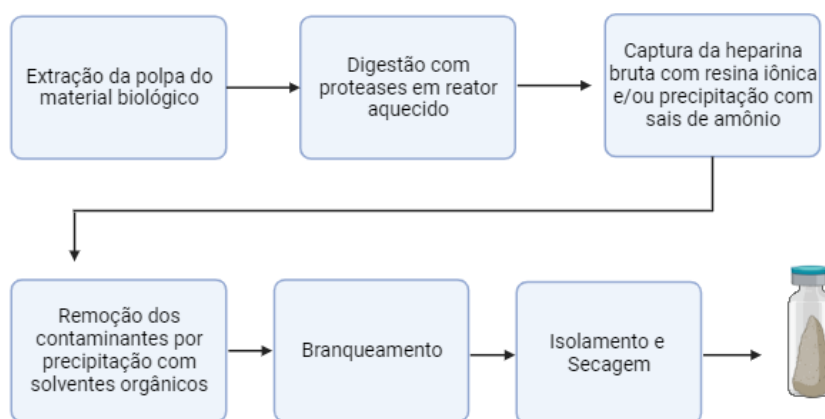
Durante o processo de isolamento e extração da heparina, as cadeias glicosaminoglicanas (GAG's) sofrem degradação parcial, produzindo um fármaco, que estruturalmente, é composto por uma mistura heterogênea de polissacarídeos sulfatados de diferentes pesos moleculares [5].

A heparina representa um avanço terapêutico importante, porque integra o manejo farmacológico das doenças cerebrovasculares. O fármaco biológico apresenta propriedades farmacocinéticas interessantes, como meia vida curta e eliminação não renal, se configurando como uma opção terapêutica para pacientes com insuficiência renal. Além disso, dispõe de antídoto específico, o sulfato de protamina. Tais características a tornaram o segundo fármaco biológico mais utilizado do mundo, integrando a lista de medicamentos essenciais da OMS e a RENAME [6].

O desenvolvimento de heparinas de baixo peso molecular, que é derivada do fracionamento da heparina convencional, aumentou a demanda sob a droga e estima-se que o mercado mundial de heparinas gire em torno de 7 mil milhões de dólares por ano, com consumo crescente de cerca de 100 toneladas/ano. A produção de heparinas em escala industrial é dependente da extração do tecido de mamíferos, cuja fonte majoritária é a mucosa intestinal suína. A China é responsável pela maior parte da produção mundial [7-9].

O processamento industrial de heparinas envolve a extração de materiais brutos dos tecidos de mamíferos por meio de proteólises químicas ou enzimáticas [9]. Uma vez que o material inicial pós-digestão apresenta baixa concentração de heparina, a etapa de captura tem por objetivo o enriquecimento do conteúdo, de forma a permitir etapas de purificação subsequentes, seguidas das etapas de isolamento e secagem [10].

Figura 1. Diagrama de blocos do processo de produção de heparina não fracionada.



Fonte: Modificado de Instituto Senai de Inovação, 2020, [11].

A heparina crua, material de partida utilizado para obtenção do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) não dispõe de monografia na Farmacopeia nem de padrão mínimo internacional [12,13]. No entanto, do ponto de vista regulatório [14], os requisitos das Boas Práticas de Fabricação (BPF) devem ser integralmente atendidos a partir da introdução do material de partida no processo produtivo.

Em 2008, uma série de reações agudas de hipersensibilidade após infusão de heparina foram reportadas ao FDA (Food Drug and Administrations) e outros órgãos sanitários da Europa. As repercussões oriundas desse episódio levaram à maior vigilância em torno da droga e à implementação de ensaios para controle de qualidade mais rigoroso. As investigações apontaram a presença de um contaminante com estrutura mimética à heparina, mas que não possui origem biológica, o sulfato de condroitina tetrassulfatado (OSCS) [12].

O controle de qualidade de heparinas é fundamental para a garantia da eficácia e segurança da terapia anticoagulante e requer metodologias analíticas de alta resolução

que permitam a sua caracterização estrutural, e, portanto, a diferenciação da heparina IFA dos demais contaminantes, bem como de ensaios biológicos sensíveis que reproduzam *in vitro* a atividade biológica esperada *in vivo*. Por ser um produto biológico, a avaliação da atividade anticoagulante de heparinas por uma combinação de ensaios é essencial. [15,16]. O objetivo do trabalho foi realizar o controle de qualidade biológico de potência de heparinas não fracionadas na forma de matéria-prima em base seca e de amostras comerciais na apresentação de solução injetável.

2. Resultados

Durante o período de novembro de 2022 a setembro de 2023, o Laboratório de Ensaios Biológicos Farmacêuticos (LEBIFAR) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) recebeu 10 amostras de heparinas não fracionadas: 7 amostras na forma de matéria-prima em base seca e 3 amostras na forma farmacêutica solução injetável em frasco-ampola de 5.000 UI/mL.

As amostras de matéria-prima foram analisadas pelos ensaios de potência anti-fator IIa, anti-fator Xa e ICPO e estão enumeradas de 1 a 7. As amostras de número 1 a 6 referem-se à heparina na base seca purificada, com potência declarada de 180UI, enquanto que a amostra de número 7 é relativa à heparina na base crua, que apresentam potência declarada de 100UI. Os resultados de potência encontrada para o ensaio do anti-fator IIa, anti-fator Xa e ICPO encontram-se dispostos nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1. Avaliação da potência e intervalos de confiança de heparina sódica matéria-prima pelo ensaio do anti-fator IIa.

| Amostra | Potência declarada (UI/mg) | Potência encontrada (UI/mg) | Potência (%) | Intervalos de confiança (%) ($p=0,95$) |
|---------|----------------------------|-----------------------------|--------------|--|
| 1 | 180 | 167,04 | 92,80 | 83,50-103,00 |
| 2 | 180 | 165,24 | 91,80 | 79,30-106,10 |
| 3 | 180 | 147,24 | 81,80 | 67,00-98,50 |
| 4 | 180 | 170,10 | 94,50 | 80,50-110,60 |
| 5 | 180 | 180,36 | 100,20 | 85,00-118,10 |
| 6 | 180 | 176,11 | 97,84 | 89,04-109,18 |
| 7 | 100 | 99,12 | 99,12 | 91,15-111,41 |

Siglas: UI- Unidade Internacional; mg- miligramas.

Tabela 2. Avaliação da potência e intervalos de confiança de heparina sódica matéria-prima pelo ensaio do anti-fator Xa.

| Amostra | Potência declarada (UI/mg) | Potência encontrada (UI/mg) | Potência (%) | Intervalos de confiança (%) ($p=0,95$) |
|---------|----------------------------|-----------------------------|--------------|--|
| 1 | 180 | 165,33 | 91,85 | 82,25-102,94 |
| 2 | 180 | 164,89 | 91,60 | 83,11-104,07 |
| 3 | 180 | 147,78 | 82,10 | 70,20-95,40 |
| 4 | 180 | 170,28 | 94,60 | 86,60-103,30 |
| 5 | 180 | 174,08 | 96,71 | 82,40-113,20 |
| 6 | 180 | 173,52 | 96,40 | 93,30-99,60 |
| 7 | 100 | 98,80 | 98,80 | 96,10-101,50 |

Siglas: UI- Unidade Internacional; mg- miligramas.

Tabela 3. Avaliação da potência e intervalo de confiança de heparina sódica matéria-prima pelo ensaio do ICPO.

| Amostra | Potência declarada (UI/mg) | Potência encontrada (UI/mg) | Potência (%) | Intervalos de confiança (%) ($p=0,95$) |
|---------|----------------------------|-----------------------------|--------------|--|
| 1 | 180 | 160,54 | 89,19 | 80,05-102,88 |
| 2 | 180 | 169,70 | 94,28 | 85,17-108,12 |
| 3 | 180 | 145,33 | 80,74 | 72,33-91,19 |
| 4 | 180 | 170,62 | 94,79 | 83,41-107,21 |
| 5 | 180 | 177,45 | 98,53 | 82,01-106,14 |
| 6 | 180 | 171,22 | 95,12 | 83,10-109,18 |
| 7 | 100 | 102,40 | 102,40 | 90,43-108,12 |

Siglas: UI- Unidade Internacional; mg- miligramas.

Em relação aos resultados obtidos para heparina crua (amostra de nº 7), a potência declarada de 100UI/mg foi atingida apenas pelo ensaio do ICPO (102,40%), embora os valores para os outros ensaios tenham tangenciado a potência estipulada.

Para atender às especificações farmacopeicas, as heparinas de matéria-prima em base seca purificadas devem apresentar valor mínimo de 180 unidades de atividade anti-fator IIa por mg de heparina [13]. A amostra 5 foi a única a apresentar conformidade com o limite especificado, ainda que o valor superior à 180UI/mg tenha sido obtido apenas pelo ensaio da atividade anti-fator IIa, que é o ensaio designado como alternativa harmonizada para avaliação de potência de heparinas não-fracionadas [16].

Todas as outras amostras não atendem ao preconizado pela especificação. A amostra nº 3 apresenta variação inferior de potência encontrada em relação ao especificado de 18,20% (anti-fator IIa), 17,90% (anti-fator Xa) e 19,26% (ICPO), o que corresponde à maior variação encontrada entre as amostras que se manteve reprodutível para os três ensaios.

As amostras de heparina na forma de preparação injetável foram analisadas pelo ensaio de ICPO e os resultados referentes à potência encontrada encontram-se explicitados na Tabela 4 abaixo. Tais amostras diferem em relação à fonte obtida, sendo a amostra de nº1 de origem bovina e as demais (nº 2 e 3), de fonte suína. Todas as análises foram realizadas no mínimo em duplicata, sendo que os ensaios de anti-fator IIa e Xa foram realizados em duplicata e o ICPO em triplicata, de acordo com o preconizado na Farmacopeia.

Tabela 4. Avaliação da potência e heparina sódico produto acabado pelo ensaio do ICPO.

| Amostra | Potência declarada (UI/mL) | Potência encontrada (UI/mL) | Potência (%) | Intervalos de confiança (%) ($N(p=0,95)$) |
|---------|----------------------------|-----------------------------|--------------|---|
| 1 | 5000 | 5271 | 105,42 | 92,17-115,09 |
| 2 | 5000 | 4759 | 95,18 | 82,10-107,30 |
| 3 | 5000 | 4808 | 96,17 | 84,30-106,98 |

Siglas: UI- Unidade Internacional; mL- mililitros.

Todas as amostras de produto acabado encontram-se em conformidade com o preconizado pela especificação farmacopeica [13], sendo a amostra de nº1 a apresentar maior variação (5,42%) em relação ao valor declarado.

3. Discussão

3.1. Potências obtidas nas amostras de matérias-primas

As amostras de matéria-prima analisadas (Tabelas 1, 2 e 3) estavam em fase de desenvolvimento e, portanto, é importante salientar o caráter preliminar destas amostras. Os resultados obtidos suscitam a melhoria dos processos de purificação e/ou da obtenção de heparina crua com maior atividade. Meer e colaboradores (2017) descrevem em seu trabalho um processo de enriquecimento denominado eluição fracionada. A afinidade da ligação da molécula de heparina às resinas aniônicas se baseia no fato de a heparina ser uma molécula carregada negativamente. Tal propriedade se relaciona ao grau de sulfatação e ao comprimento das cadeias que as moléculas de heparina apresentam, o que reflete em sua atividade biológica [9,10].

A eluição fracionada consiste na aplicação de uma resina de troca iônica com uma etapa de lavagem com um agente de força iônica relativamente baixa, geralmente uma solução de cloreto de sódio a porcentagens baixas (<3,5%), que levam à obtenção de cadeias de heparinas com maior atividade [10].

O trabalho supracitado relata a obtenção de frações de heparina com atividade aumentada em até 2,5 a 5 vezes em relação ao material bruto, com a utilização de uma resina carregada de celulose funcionalizada com amônio, lavada com solução de cloreto de sódio a 2,3% seguida de eluição fracionária com gradiente de 2,3 a 8,2% de cloreto de sódio [10].

A alta variabilidade inerente a um insumo biológico como a heparina torna oportuna a determinação da potência por diferentes ensaios, possibilitando um panorama mais assertivo no que tange à escolha de insumo com atividade/massa adequada para a obtenção de matéria-prima de grau farmacêutico [16].

A maior diferença de potência obtida entre os ensaios realizados para a mesma amostra corresponde a 3,61%, relativos à amostra n° 1, o que se mostrou dentro do limite estabelecido para ensaios biológicos [17]. Os resultados obtidos demonstram concordância satisfatória entre os métodos, ainda mais, considerando que os ensaios anti-fator IIa e anti-fator Xa são métodos cromogênicos e o ICPO, um método baseado na coagulação. Tal resultado está em concordância com o trabalho de Dalmora e colaboradores (2009), em que o ensaio anti-fator IIa apresentou correlação significativa ($P > 0.05$) para os ensaios de anti-fator Xa e ICPO, apresentado diferença de potência de 1,22% e 1,78%, respectivamente.

3.2. Potências obtidas nas amostras de produto acabado

A heparina na forma de produto acabado é uma solução estéril de heparina sódica diluída em água para injeção. A especificação vigente aplicável às preparações injetáveis de heparina estabelece limite de 90 a 110% de potência anticoagulante a partir da potência declarada em rótulo pelo fabricante [13].

Tendo em vista que os produtos analisados estão prontos para comercialização, cujo destino final é a administração no paciente, é fundamental que estes estejam em observância com os requisitos mínimos de BPF de medicamentos previstos na RDC 658/2022. Em seu Artigo 13, a resolução supracitada determina que os produtos acabados não sejam comercializados nem distribuídos até que a qualidade tenha se mostrado satisfatória [18].

A heparina é classificada como um Medicamento de Alta Vigilância (MAV). Tal classificação é atribuída a medicamentos de ampla utilização em instituições de saúde e que apresentam alto risco de lesões ao paciente quando administrados incorretamente [19]. Em alerta emitido pela ANVISA [20], publicado em 28/12/2006, o órgão sanitário solicita os profissionais de saúde a notificarem casos suspeitos de trombocitopenia induzida à heparina (HIT) e de trombocitopenia e trombose induzida por heparina (HITT), reações adversas graves mediadas por anticorpos que podem persistir por semanas mesmo após a descontinuação da droga.

Nesse sentido, faz-se t nu  a relação entre o devido cumprimento das especificações farmacopeicas de potência e a ocorrência de eventos adversos, uma vez que abaixo do limite inferior de potência, a atividade anticoagulante não é assegurada e acima do limite superior, a segurança do paciente é comprometida, no que tange à exacerbação de complicações clínicas potencialmente graves como sangramento, reações imunológicas como HIT e HITT, osteopenia e outros [21,22].

A avaliação comparativa dos valores de potência *versus* a fonte de origem animal em que a heparina foi obtida   aplicável apenas ao IFA, de forma que não se estende a produtos acabados, por estes estarem suscetíveis a ajuste de atividade após análise da matéria-prima e/ou sofrerem interferência de excipientes da formulação. No entanto, alguns aspectos relacionados à fonte de obtenção da heparina merecem ser discutidos. A crise no mercado de heparinas em decorrência da contaminação com OSCS e a redução da população de animais pela peste suína africana foram eventos marcantes que levantaram o debate em torno da diversificação da fonte de obtenção de heparinas tendo em vista evitar o desabastecimento da cadeia produtiva [3,4,7].

Diferenças físico-químicas, de composição e farmacológicas são relatadas em relação   heparinas obtidas por diferentes fontes [8,9,23]. A atividade anticoagulante das heparinas não fracionadas de origem suína (~180 UI/mg)   tipicamente maior, variando de 30 a 50% a mais, em relação às heparinas obtidas a partir de tecidos bovinos (~130UI/mg) [7,24, 25].

A menor atividade da heparina bovina está associada a um menor grau de sulfatação de suas cadeias [8,10,26]. Acredita-se que a menor densidade de carga da heparina bovina resulte em menor afinidade pela trombina [23]. Baig e colaboradores (2019) realizaram a análise das frações dissacar dicas utilizando cromatografia de troca ani nica. O trabalho revelou que a atividade anticoagulante das frações dissacar dicas aumentou proporcionalmente ao teor de sulfatação e ainda, que a heparina bovina apresenta composição com maior proporção de frações dessulfatadas.

Os resultados encontrados no trabalho realizado por Fu e colaboradores (2019) mostraram que   possível a obtenção de heparina bovina intestinal remodelada com atividade aumentada semelhante às de heparina de suína intestinal através de tratamento com heparinases biossintéticas (6-OST-1, 6-OST-2 e 3-OST-1). A heparina bovina intestinal tratada apenas com 3-OST-1 também apresentou heparina com requisitos de atividade antitromb nica e anti-fator Xa equivalentes à heparina suína intestinal.

Jeske e colaboradores (2019) trazem em seu trabalho a utilização de sulfotransferases para aumentar o grau de sulfatação nas posições 6-O e/ou 3- a fim de desenvolver preparações de heparina bovina que se assemelham mais   heparina suína. As heparinas modificadas obtidas evidenciaram um aumento de sítios de ligação   antitrombina, bem como aumento de atividades anti-Xa e anti-IIa.

A neutralização   protamina é outro aspecto que varia de acordo com a origem biológica da heparina. A heparina bovina com potência ajustada requer maiores quantidades de protamina para atingir a neutralização em comparação com a suína [7,24].

A utilização de heparinas de origem biológicas distintas sem levar em conta a diferença de atividade que estas apresentam não é recomendado, a julgar pela ocorrência incomum de sangramento p s-operatório após a descontinuação da heparina suína de referência (Liquemine) [23]. Acredita-se que os eventos hemorrágicos podem ser atribuídos   neutralização com protamina inadequada pela administração de preparações de heparina bovina, enquanto os protocolos de neutralização de protamina se baseavam na heparina suína [9].

As diferenças entre as heparinas bovina e a heparina suína limitam a intercambiabilidade entre estas e levaram a Farmacopéia Brasileira a publicar novas monografias que consideram a heparina bovina e heparina suína como Insumos Farmacêuticos ativos distintos. Tal iniciativa pode ser encarada como um passo importante para o uso seguro como heparinas não fracionadas intercambiáveis [9].

4. Materiais e Métodos

4.1. Reagentes e Produtos Farmacêuticos

Padrão secundário de heparina sódica suína (Fabricante: Octalab, São Paulo, Brasil - Lote: 16037), contendo 50.000 UI/ampola, padronizado frente ao 6° Padrão Internacional de heparina não fracionada (WHO 07/328). Fator Xa de plasma bovino 70 nKAT/Frasco (Chromogenix, Estados Unidos). Substratos cromogênicos S-2765 (25 mg/frasco) e S-2238 (25 mg/frasco) (Chromogenix, Estados Unidos). Antitrombina III humana 10UI/ampola (Chromogenix, Estados Unidos). Hidróxido de sódio P.A. (Neon, São Paulo, Brasil). EDTA dissódico P.A. (Neon, São Paulo, Brasil). Tris (hidroximetil) aminometano P.A. (Neon, São Paulo, Brasil). Albumina bovina 25 mg (Inlab, São Paulo, Brasil). Trombina de plasma humano 1020 NHI (Fator IIa) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Cloreto de sódio PA e cloreto de cálcio anidro Purex (Alamar técnico científico LTDA, São Paulo, Brasil). Ácido acético glacial 99,8% P.A. (Neon, São Paulo, Brasil). Plasma ovino citratado (Bionutrientes, São Paulo, Brasil- Lote: 051022-POC). Seis amostras de matéria-prima em processo de purificação contendo potência declarada de 180 UI/mg e uma amostra de heparina crua com potência declarada de 100 UI/mg. Três amostras de produtos farmacêuticos comerciais de heparina contendo, 5.000 UI/mL, provenientes de um único laboratório em seu prazo de validade.

4.2. Ensaio de Inibição da Coagulação do Plasma Ovino

O ensaio foi realizado conforme monografia da heparina descrita na Farmacopéia Brasileira, 4ª edição. Determinou-se a concentração do padrão e da amostra, que na presença de 1 mL de plasma ovino citratado e recalificado com 0,2 mL de cloreto de cálcio a 1%, após 1h de incubação em termostato à 37 °C, permitiu o grau de coagulação de 50%. Procedeu-se registro da extensão da coagulação em cada tubo e realizou-se a análise dos resultados experimentais pelo método das médias móveis [6, 20,21].

4.3. Ensaio de Atividade Anti-fator Xa

Para o ensaio de atividade anti-FXa foi utilizada uma microplaca de 96 poços que foi incubada a 37 °C por 15 minutos em termostatizador (Logen Scientific) com 25 µL da solução padrão em cinco concentrações (0,06, 0,12, 0,15, 0,18 e 0,21 UI/mL, selecionados com base na região linear) e 25 µL de amostras em duplicata para estabelecer uma curva dose-resposta. Adicionou-se 30 µL de antitrombina diluída para a concentração de 0,0375 UI/mL aos poços e agitou-se suavemente por 2 minutos a 37 °C. Após o período de incubação, foram adicionados 50 µL de FXa diluído para concentração de 3,5 nKat e novamente agitado suavemente a 37 °C por 2 minutos. Por fim, foram adicionados 125 µL de substrato cromogênico específico para Fxa diluído para concentração de 0,05 mM, incubados a 37 °C e agitados suavemente por mais 5 minutos. A reação foi interrompida com 75 µL de ácido acético a 42%. Procedeu-se à leitura da absorvância em leitor de microplacas (Multiskanfc, Thermo Scientific) a 405 nm [15,19].

4.4. Ensaio de Atividade Anti-fator IIa

Foi utilizada uma microplaca de 96 poços, incubada a 37 °C por 15 minutos em termostatizador (Logen Scientific). 25 µL de cinco concentrações padrão (0,03, 0,06, 0,12, 0,15 e 0,18 UI/mL selecionadas com base na região linear) e 25 µL da amostra nas mesmas concentrações foram duplicados para estabelecer uma curva dose-resposta. Adicionou-se 25 µL de antitrombina diluída para a concentração de 0,0625 UI/mL aos poços e procedeu-se a incubação da microplaca a 37 °C, com agitação suave por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 60 µL de Fator IIa, com incubação a 37 °C e agitação suave por dois minutos. Por fim, foram adicionados 125 µL de substrato cromogênico específico para FIIa diluído para concentração de 0,05 mM, incubados a 37 °C e agitados suavemente por 5 minutos. A reação foi interrompida com 50 µL de solução de ácido acético a 42%. A

absorbância foi obtida em leitor de microplacas (Multiskan Fc, Thermo Scientific) a 405 nm [15,19].

5. Conclusões

O surto causado pela contaminação de preparações de heparina entre 2007 e 2009 teve severas repercussões, como revisão das monografias de heparina, recall dos lotes contaminados e até mesmo adição de novos métodos a fim reforçar o controle de qualidade da droga.

Tendo em vista que a heparina é um Medicamento de Alta Vigilância, com risco potencial associado ao seu uso, dada à gravidade de suas reações adversas, torna-se imprescindível a disponibilidade e aplicação de métodos validados e acurados no controle de qualidade da matéria-prima e de produtos acabados.

Os resultados obtidos contribuem para a adequação dos processos envolvidos na obtenção de heparinas, colaborando para a produção de matérias-primas em desenvolvimento de melhor qualidade. Ademais, contribuem também para assegurar a qualidade de produtos acabados que estão em uso clínico. A determinação da potência por diferentes ensaios torna-se oportuna, visando garantir com precisão a obtenção de matéria-prima de grau farmacêutico. As preparações injetáveis de heparina não fracionada (HNF) devem estar em observância com as especificações farmacopeicas e legislações sanitárias pertinentes, de modo a salvaguardar a saúde da população. O monitoramento da qualidade das heparinas além de verificar a conformidade com as normas vigentes podem servir como suporte para basear tomada de decisão e ações estratégicas de órgãos sanitários competentes como a ANVISA.

Financiamento: Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Apoio à Pesquisa e à Extensão (FAPEX), cujo apoio financeiro permitiu a submissão do artigo na presente revista.

Conflitos de Interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

1. BRASIL. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas e Agravos não Transmissíveis no Brasil 2021-2030. Ministério da Saúde, Brasília, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-contenido/publicacoes/svsa/doencas-cronicas-nao-transmissiveis-dcnt/09-plano-de-dant-2022_2030.pdf. Acesso em: 24 abr.
2. KHIELLA, M., et al. Bovine Heparin Compared to Porcine Heparin to Demonstrate Bioequivalence. *Blood*, 2018, v. 132, p.1253. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-118809>.
3. OLSON, G., et al. Potency Adjusted Blended Heparin of Bovine, Ovine and Porcine Exhibit Comparable Biologic Effects to Referenced Single-Sourced Porcine Heparin. *Clin Appl Thromb Hemost.*, 2023, v. 29. doi: [10.1177/10760296231163251](https://doi.org/10.1177/10760296231163251).
4. KOUTA, M.S.A., et al. Comparative Pharmacological Profiles of Various Bovine, Ovine and Porcine Heparins. *Clin Appl Thromb Hemost.*, 2019, v.25, p. 1-9. doi: [10.1177/1076029619889406](https://doi.org/10.1177/1076029619889406).
5. JUNQUEIRA, D.R.G., et al. Farmacovigilância da heparina no Brasil. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 2011, v.57, p.328-332. doi: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302011000300017>.
6. ANJOS, D. P., et al. 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 (TTPA). *Rev Inst Adolfo Lutz.*, 2012, v.71, p.566-572.
7. JESKE, W., et al. Bovine Mucosal Heparins Are Comparable to Porcine Mucosal Heparin at USP Potency Adjusted Levels. *Front. Med.*, 2019, v. 5. doi: [10.3389/fmed.2018.00360](https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00360).
8. FU, L. et al. Enzymatic Generation of Highly Anticoagulant Bovine Intestinal Heparin. *J Med Chem.*, 2017, v. 60, p. 8673–8679. doi: [10.1021/acs.jmedchem.7b01269](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01269).
9. VILANOVA, E., et al. Heparins Sourced From Bovine and Porcine Mucosa Gain Exclusive Monographs in the Brazilian Pharmacopeia. *Front. Med.*, 2019, v. 6. doi: [10.3389/fmed.2019.00016](https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00016).
10. MEER, J.-Y.; KELLENBACH, E.; BOS, L. From Farm to Pharma: An Overview of Industrial Heparin Manufacturing Methods. *Molecules*, 2017, v. 22, p. 1025. doi: [10.3390/molecules22061025](https://doi.org/10.3390/molecules22061025).
11. TOVAR, A., et al. Heparinas e COVID-19: Desafios e oportunidade para o mercado brasileiro. Instituto SENAI de Inovação. Disponível em: <https://senaicetiqt.com/nota-tecnica-heparinas-e-covid-19-desafios-e-oportunidades-para-o-mercado-brasileiro/>.

12. DEVLIN, A., et al. Tools for the Quality Control of Pharmaceutical Heparin. *Medicina*, **2019**, v. 55, p. 636. doi: <https://doi.org/10.3390/medicina55100636>.
13. BRASIL. Volume II-Monografias, Produtos Biológicos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, **2019**. p. 53.
14. BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 654 de 24 de março de 2022: Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos. Diário Oficial da União. 30 mar 2022.
15. DALMORA, S.L., et al. Biological potency evaluation and physicochemical characterization of unfractionated heparins. *Rev Bras Hematol Hemoter*, **2009**, v.31, p.326-332. doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000074>.
16. VACCARI, S.M., et al. Avaliação comparativa da atividade biológica de heparinas não-fracionadas em produtos farmacêuticos. *Rev Bras Hematol Hemoter*, **2003**, v.25, p.103-110. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842003000200006>.
17. BRASIL. Volume I / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2019. p. 723.
18. BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 658 de 30 de MARÇO de 2022: Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União. 31 mar 2022.
19. MEDEIROS, R.J., et al. Avaliação da potência das heparinas não fracionadas comercializadas no Brasil por meio dos ensaios cromogênicos antifator Xa e antifator IIa e teste de coagulação. *Vigil Sanit Debate*, **2023**,v.11. doi: <https://doi.org/10.22239/2317-269X.01923>.
20. Site ANVISA: Heparina: risco de início tardio de trombocitopenia e trombose. Disponível em https://antigo.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p_p_id=101_INSTANCE_R6VaZWzQDDzS&p_p_col_id=column-1&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_R6VaZWzQDDzS_groupId=33868&_101_INSTANCE_R6VaZWzQDDzS_urlTitle=alerta-snvs-anvisa-nuvig-ufarm-n-6-de-28-de-dezembro-de-2006&_101_INSTANCE_R6VaZWzQDDzS_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_R6VaZWzQDDzS_assetEntryId=401017&_101_INSTANCE_R6VaZWzQDDzS_type=content.
21. AREPALLY, G. M.; ORTEL, T. L. Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Annu Rev Med*, **2010**, v. 61, p. 77-90. doi:10.1146/annurev.med.042808.171814.
22. HARTER, K.; LEVINE, M.; HENDERSON, S. Anticoagulation Drug Therapy: A Review. *West J Emerg Med*, **2015**, v. 16, p. 11-17. doi: 10.5811/westjem.2014.12.22933.
23. AQUINO, R.S., et al. Heparins from porcine and bovine intestinal mucosa: Are they similar drugs?. *Thromb Haemost.*, **2010**, v. 103, p. 1005-1015. doi: 10.1160/TH09-11-0761.
24. NOGUEIRA, A.V., et al. Biological and structural analyses of bovine heparin fractions of intermediate and high molecular weight. *Carbohydr Polym.* **2017**. v. 157, p. 72-78. doi:10.1016/j.carbpol.2016.09.061.
25. BAIG, N. et al. Potency Equated Porcine and Bovine Mucosal Heparin Are Bioequivalent in Terms of Biochemical and Pharmacological Effects. *Blood*, **2019**, v. 134, p. 3665. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2019-126075>.
26. XIE, S., et al. Preparation of low molecular weight heparins from bovine and ovine heparins using nitrous acid degradation. *Carbohydr Polym.*, **2018**, v. 197, p. 83-91. Doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.070.

Isonção de Responsabilidade/ Nota do editor: As declarações, opiniões e dados contidos em todas as publicações são exclusivamente do(s) autor(es) individual(is) e não da BIOFARM e/ou dos editores(es). A BIOFARM e/ou o(s) editor(es) isentam-se de responsabilidade por qualquer dano a pessoas ou propriedades resultante de quaisquer ideias, métodos, instruções ou produtos referidos no conteúdo.