

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

THAIS CORREIA DE SOUSA

**HEPARINA: UM ESTUDO DA LITERATURA SOBRE CARACTERÍSTICAS,
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MÉTODOS APLICADOS À SUA ANÁLISE**

GOIÂNIA
2022

05/04/2022 22:43

SEI - Documento para Assinatura

Processo:
23070.005983/2022-66

Documento:
2672303



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Thais Correia de Sousa

Título do trabalho: Heparina: um estudo da literatura sobre características, propriedades físico-químicas e métodos aplicados à sua análise

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [x]
SIM [] NÃO?

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(a)(s) autor(a)(es)(as) e ao(a) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Luis Antônio Dantas Silva, Professor do Magistério Superior**, em 29/03/2022, às 15:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **THAÍS CORREIA DE SOUSA, Discente**, em 29/03/2022, às 15:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2672303** e o código CRC **9BAFE398**.

THAIS CORREIA DE SOUSA

**HEPARINA: UM ESTUDO DA LITERATURA SOBRE CARACTERÍSTICAS,
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MÉTODOS APLICADOS Á SUA ANÁLISE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para a obtenção de grau de
Bacharel em Farmácia à Faculdade de
Farmácia da Universidade Federal de
Goiás

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Dantas
Silva

GOIÂNIA
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Sousa, Thais Correia de
HEPARINA: UM ESTUDO DA LITERATURA SOBRE
CARACTERÍSTICAS, PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E
MÉTODOS APLICADOS À SUA ANÁLISE [manuscrito] / Thais Correia
de Sousa. - 2022.
XXIX, 29 f.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Dantas Silva.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia,
2022.

Bibliografia.

Inclui siglas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Heparina. 2. Isolamento da heparina. 3. Quantificação da
heparina. I. Silva, Luís Antônio Dantas, orient. II. Título.

CDU 615.1



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e nove dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e dois iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado "Heparina: um estudo da literatura sobre características, propriedades físico-químicas e métodos aplicados à sua análise", de autoria de Thais Correia de Sousa, do curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Prof. Dr. Luís Antônio Dantas Silva (FF/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Profa. Dra. Danielle Guimarães Almeida Diniz (FF/UFG) e Dra. Carla Santos de Freitas (FarmaTec-FF/UFG). Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de (7,5 - sete e meio), tendo sido o TCC considerado (aprovado).

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luís Antônio Dantas Silva, Professor do Magistério Superior**, em 29/03/2022, às 15:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danielle Guimarães Almeida Diniz, Professor do Magistério Superior**, em 29/03/2022, às 15:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **CARLA SANTOS DE FREITAS, Usuário Externo**, em 29/03/2022, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joana D'arc Ximenes Alcanfor, Coordenadora de Curso**, em 06/04/2022, às 13:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2672297** e o código CRC **BFD27502**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcos e Vânia, que foram o alicerce da minha vida, que nunca desistiram de mim e nunca me deixaram desistir.

À minha irmã, Nathalia, a minha inspiração de vida e de integridade.

Ao meu noivo, Diego, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando, e me incentivando a ser uma pessoa melhor.

Aos meus amigos, que estiveram comigo durante toda a minha trajetória, fazendo o dia-a-dia se tornar mais leve. Em especial: Isabela, Thays, Lays e Isadora.

Ao meu orientador, que abriu as portas do laboratório e me auxiliou com suas precisas e incisivas pontuações.

À todos os docentes da Faculdade de Farmácia, que me fizeram apaixonar pelo meu curso.

À todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para o sucesso desse trabalho.

À Deus, por me amar incondicionalmente, ter me dado vida e oportunidades inesquecíveis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura química da heparina	13
Figura 2 - Fluxograma de produção da heparina a partir da mucosa bovina ou suína.....	21
Figura 3 - Fluxograma de Produção de Heparina a partir da heparina <i>in natura</i>	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Literatura selecionada para inclusão da comparação de métodos analíticos, sendo classificados por referências, país de origem, tipo de estudo e método analisado.....	18
Tabela 2 - Estudos selecionados para descrição de origem e obtenção de heparina, sendo classificados quanto à referência, título, país de origem, tipo de estudo e aplicação no texto.....	19

LISTA DE SIGLAS

HNF	Heparina não fracionada
HBPM	Heparina de Baixo Peso Molecular
UV	Ultravioleta
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
TVP	Trombose Venosa Profunda
BPF	Boas Práticas de Fabricação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
FATOR Xa	Fator X ativado

RESUMO

A heparina pertence à família das glicosaminoglicanas e é um polissacarídeo natural derivado de tecidos animais, que possui potente atividade anticoagulante. É um polímero, sendo sua molécula composta por unidades monoméricas repetidas e é constituído principalmente por 4 unidades ligadas de ácido α -L-idurônico 2-sulfato (α -IdA-2S) e α -D-glucosamina N,6-dissulfatada. O processo de isolamento da heparina é regulamentado através das legislações vigentes no Brasil, que possuem o objetivo de inspecionar a qualidade dos mesmos. Algumas técnicas usadas para identificação das sequências sacarídicas da heparina são: ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e sistemas eletroforéticos, turbidimetria e métodos cromatográficos. Assim, o um estudo em questão se trata de uma análise do tipo bibliográfica, descritivo-exploratório e retrospectivo, contando com estudos de 1991 a 2021, com análise integrativa, sistematizada e qualitativa, tendo como objetivo geral, analisar as propriedades físico-químicas e os principais métodos analíticos de quantificação da heparina, levantados da literatura técnico-científica. Após a definição do tema, foi realizada uma busca em bancos de dados virtuais, na Biblioteca Virtual do Scientific Electronic Library online (SciELO), Google Scholar e Periódicos CAPES. Foram utilizados os termos "heparina", "quantificação da heparina" e "métodos analíticos". O passo seguinte foi uma leitura exploratória no período de julho de 2021 até março de 2022 das publicações, foram selecionadas publicações dos anos de 1991 até 2021, caracterizando, assim, o estudo retrospectivo das publicações. Após a análise dos artigos selecionados, foi possível concluir que a heparina possui várias aplicações, e as formas de sua investigação precisam ser amplificadas para a melhor compreensão do seu mecanismo de ação em diferentes sistemas.

Palavras-chave: Heparina; Isolamento da Heparina; Quantificação da Heparina

ABSTRACT

Heparin belongs to the glycosaminoglycan family and is a natural polysaccharide derived from animal tissues, which has potent anticoagulant activity. It is a polymer, and is a molecule composed of repeating monomeric units and is mainly made up of 4 linked units of α -L-iduronic acid 2-sulfate (α -IdA-2S) and α -D-glucosamine N,6-disulfated. The process of isolation of heparin is performed through the current legislation in Brazil, which aims to inspect its quality. Some techniques used for heparin quantification are: nuclear magnetic resonance, mass spectrometry and electrophoretic systems, turbidimetry and chromatographic methods. Thus, the study in question is a bibliographic, descriptive-exploratory and retrospective type analysis, with studies from 1991 to 2021, with integrative, systematized and qualitative analysis, having as general objective, to analyze the physical-chemical properties and the main analytical methods for quantification of heparin, raised from the technical-scientific literature. After defining the theme, a search was performed in virtual databases, the Virtual Library of the Scientific Electronic Library online (SciELO), Google Scholar and CAPES Periodicals. The terms "heparin", "heparin quantification" and "analytical methods" were used. The next step was an exploratory reading in the period from July 2021 to March 2022 of the publications from the years 1991 to 2021 were selected, thus characterizing the retrospective study. After the analysis of the selected articles, it was possible to conclude that heparin has several applications, and the forms of its investigation need to be expanded to better understand its mechanism of action in different systems.

Keywords: Heparin; Heparin isolation; Heparin quantification

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 METODOLOGIA	17
3.1 ESTRATÉGIA DE BUSCA.....	17
4 REFERENCIAL TEÓRICO	18
4.1 LITERATURA UTILIZADA PARA COMPARAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	18
4.2 LITERATURA UTILIZADA PARA DESCRIÇÃO DE ORIGEM E OBTENÇÃO DE HEPARINA.....	19
4.3 OBTENÇÃO DA HEPARINA.....	20
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DA HEPARINA.....	22
4.4.1 Método turbidimétrico.....	22
4.4.2 Método cromatográfico.....	23
4.4.3 Método espectrofotométrico.....	24
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

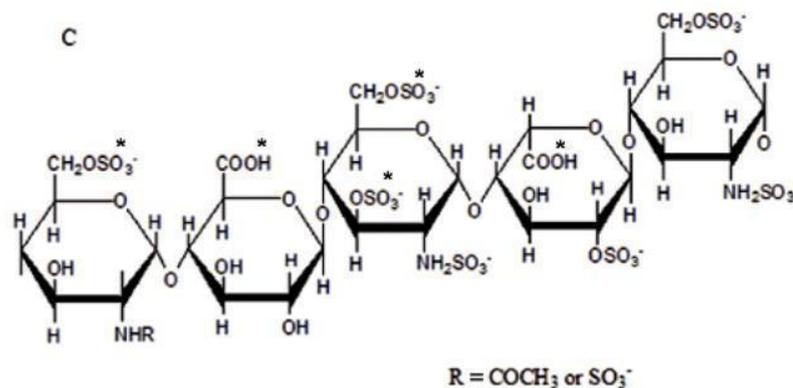
1 INTRODUÇÃO

A heparina pertence à família das glicosaminoglicanas, sua molécula é sulfatada, ácida e carregada negativamente (MARROTA-OLIVEIRA; MARCHETTI, 2011). Sua descoberta ocorreu em 1916 por McLean, na Universidade John Hopkins e isolou o composto de fígado de cachorros (BAYTAS.; LINHARDT, 2020), McLean estava buscando extrair substâncias tromboplásticas de vários tecidos, e acabou encontrando uma substância com potente atividade anticoagulante (SILVA *et al.*, 2018), sendo a heparina considerada o segundo biofármaco mais utilizado no mundo (MARROTA-OLIVEIRA; MARCHETTI, 2011).

A heparina é um polissacarídeo linear constituído principalmente por 4 unidades ligadas de ácido α -L-idurônico 2-sulfato (α -IdA-2S) e α -D-glucosamina N,6-dissulfatada, assim representada na Figura 1. Outras unidades minoritárias encontradas na molécula são o ácido não sulfatado α -L-idurônico, α -D-glucosamina N-acetilada ou N, 3, 6-trissulfatada, e resíduos de ácido β -D-glucurônico. A proporção destas unidades no polímero de heparina está diretamente relacionada com o tecido utilizado para a sua extração (TOVAR, et al, 2016).

Possui solubilidade em água, é um pó branco ou quase branco, moderadamente higroscópico, com coeficiente de partição -13,2 e pH 5 á 8 (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

Figura 1: Representação da estrutura química da heparina composta por unidades monoméricas repetidas



Fonte: Adaptado de MULLOY *et al.*, 2016

A heparina divide-se em duas classes: a heparina não fracionada (HNF) e a heparina de baixo peso molecular (HBPM). As HBPM são derivadas da HNF por processo de despolimerização química ou enzimática (YOSHIDA, 2016).

As HNFs são polissacarídeos que, durante o isolamento dos tecidos animais, se degradam lentamente, construindo uma mistura desigual de fragmentos com massa molecular entre 3.000 e 30.000 Daltons e as HBPM que são adquiridas por meio da despolimerização controlada da HNF, que formam produtos com massas moleculares entre 4000 e 6000 Daltons. As HBPM são formadas por fragmentos, que possuem as mesmas funções das HNF (SILVA, *et al.*, 2018). As duas são anticoagulantes utilizados por anos na terapêutica, como medida profilática contra a trombose venosa profunda (TVP), embolia pulmonar e rotineiramente no pré-operatório (MARROTA-OLIVEIRA; MARCHETTI, 2011).

A heparina de baixo peso molecular é representada pela dalteparina sódica, enoxaparina sódica, nadroparina cálcica, parnaparina sódica, reviparina sódica e tinzaparina sódica (PERES, 2015).

Embora o complexo heparina-AT III inative a trombina, a HBPM e o complexo antitrombina são mais específicos para o Fator X ativado (Fator Xa). Por conta da meia-vida curta da heparina e da ocorrência de sangramento, o uso da HBPM têm sido mais praticado, do que da HNF, estudos revelam que o risco de tromboembolismo e principalmente a incidência de sangramento é significativamente menor, outro fator observado é o tempo de permanência e o custo hospitalar, que são menores (DURMAZ *et al.*, 2012).

Várias técnicas são utilizadas nos processos de obtenção das HBPM, por meio dessas técnicas inúmeras formas de HBPM são elaboradas, as encontradas no Brasil são: Ardeparina sódica, Enoxaparina, Dalteparina sódica, Nadroparina cálcica. Porém, a enoxaparina é a mais indicada e segura, por apresentar melhor atividade anticoagulante, propiciando mais segurança em casos gestacionais e por possuir a protamina, substância capaz de reverter os efeitos anticoagulantes da heparina (TOMA *et al.*, 2013).

As vias de administração para o uso da heparina são a endovenosa e a subcutânea. Em relação a necessidade de doses elevadas ou para efeito imediato, recomenda-se a via endovenosa, em casos de doses menores, a via utilizada é a subcutânea, que pode ser empregada de 5.000 a 7.500 UI de heparina a cada oito ou doze horas. Para a via endovenosa, a dose administrada deve ser de 1000 a 2000 UI

em infusão contínua (LARA, 2020).

A obtenção da heparina que é um anticoagulante comercializado por várias indústrias farmacêuticas é feita através da retirada de mucosas de origem bovina e suína (MEDEIROS, 2020). A China é a maior produtora, assim abastecendo mais da metade da demanda mundial (BRITO *et al.*, 2018), sendo esse um dos motivos de ultimamente ter crescido o número de pesquisas, com o objetivo de avaliar e quantificar as glicosaminoglicanas (MARROTA-OLIVEIRA; MARCHETTI, 2011).

Algumas técnicas usadas para os estudos de determinação de sequências sacarídicas que compõem a molécula da heparina são: ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e sistemas eletroforéticos (PATEL *et al.*, 2008; MOURIER; VISKOV, 2004). A turbidimetria e o método cromatográfico que também vêm sendo muito utilizados, além desses, o método espectrofotométrico UV que tem baixo custo e pouca utilização de tempo em comparação com o HPLC (SAHU; LARIYA, 2019; OLIVEIRA, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Realizar um levantamento bibliográfico, descrever propriedades físico-químicas e discutir os métodos analíticos descritos na literatura para quantificação da heparina.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever as características químicas e as propriedades físico-químicas da heparina;
- Levantar na literatura técnico-científica trabalhos acadêmicos, artigos e textos que descrevam sobre métodos de quantificação da heparina;
- Descrever e sistematizar os diferentes métodos e ferramentas analíticas para quantificação da heparina descritos nos textos avaliados.

3 METODOLOGIA

3.1 Estratégia de busca

A metodologia usada no estudo em questão consistiu em um estudo descritivo-exploratório e retrospectivo, com análise integrativa, sistematizada e qualitativa.

Após a definição do tema, foi realizada uma busca em bancos de dados virtuais, na Biblioteca Virtual do Scientific Electronic Library online (SciELO), Google Scholar e Periódicos CAPES. Foram utilizados os termos “heparina”, “quantificação da heparina” e “métodos analíticos”. O passo seguinte foi uma leitura exploratória no período de julho de 2021 até março de 2022, e foram selecionadas publicações dos anos de 1991 até 2021, caracterizando, assim, o estudo retrospectivo das publicações.

Os critérios usados para inclusão de informações na análise foram: a) uso da heparina em humanos; b) publicações realizadas entre 1991 e 2021; c) métodos de obtenção da heparina; d) métodos de quantificação da heparina; e) artigos escritos na língua inglesa; f) artigos de revisão; g) artigos na língua portuguesa; h) propriedades físico-químicas da heparina.

Já como critérios de exclusão, foram utilizados os seguintes parâmetros: a) trabalhos que envolvam o uso da heparina em outras espécies que não sejam a humana; b) pesquisas publicadas em outros idiomas que não sejam o inglês; c) materiais constando em anais de congresso e conferências.

A partir das anotações da tomada de apontamentos, foram confeccionados fichamentos, em fichas estruturadas em um documento do Microsoft Word, que objetivaram a identificação das obras consultadas, o registro do conteúdo das obras, o registro dos comentários acerca das obras e a ordenação dos registros. Os fichamentos propiciaram a construção lógica do trabalho, que consistiram na coordenação das ideias, acatando os objetivos da pesquisa.

A seguir, os dados apresentados foram submetidos à análise de conteúdo. Posteriormente, os resultados foram discutidos com o suporte de outros estudos, provenientes de revistas científicas e livros.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Literatura utilizada para comparação de métodos analíticos

Após a análise dos resultados obtidos nas bases de dados, foi selecionada a literatura apresentada na Tabela 1.

Tabela 1- Literatura selecionada para inclusão da comparação de métodos analíticos, sendo classificados por referências, país de origem, tipo de estudo e método analisado.

Referências	Título	País de Origem	Tipo de Estudo	Método analisado
Oliveira, S. S. M. 2009	<i>Preparação e caracterização in vitro de micropartículas de heparina fracionada potencialmente aplicáveis ao tratamento da trombose venosa profunda</i>	Brasil	Tese de doutorado	Turbidimetria
Mesquita, A. C. T. 2016	<i>Avaliação e otimização de metodologia turbidimétrica para a quantificação de heparina de baixo peso molecular utilizando planejamento de experimentos</i>	Brasil	Trabalho de Conclusão de Curso	Turbidimetria
Ouyang, Y. et al. 2017	<i>Qualitative and quantitative analysis of heparin and low molecular weight heparins using size exclusion chromatography with multiple angle laser scattering/refractive index and inductively coupled plasma/mass spectrometry detectors.</i>	China	Artigo Original	Cromatografia
Mulloy, B. et al. 2016	<i>Pharmacology of Heparin and Related Drugs.</i>	Inglaterra	Artigo Original	Cromatografia

Tovar et al. 2016	<i>Structural and haemostatic features of pharmaceutical heparins from different animal sources: challenges to define thresholds separating distinct drugs</i>	Brasil	Artigo Original	Cromatografia por troca iônica
Chengalva, P.; Gundala, A. 2017	<i>Development and validation of UV spectrometric method for quantitative determination of enoxaparin sodium in bulk and injectable</i>	Índia	Artigo Original	Espectrofotometria UV

4.2 Literatura utilizada para descrição de origem e obtenção de heparina

Os estudos dos quais foram extraídas informações para discorrer sobre a origem e obtenção de heparina estão classificados na Tabela 2.

Tabela 2 - Estudos selecionados para descrição de origem e obtenção de heparina, sendo classificados quanto à referência, título, país de origem, tipo de estudo e aplicação no texto.

Referência	Título	País de Origem	Tipo de Estudo	Aplicação no texto
Tovar et al. 2016	<i>Structural and haemostatic features of pharmaceutical heparins from different animal sources: challenges to define thresholds separating distinct drugs</i>	Brasil	Artigo Original	Origem da heparina
MAJERUS, P. W. et al	<i>Medicamentos Anticoagulantes, Antitibióticos e Trombolíticos, In: GOODMAN & GILMAN, As Bases Farmacológicas da Terapêutica</i>	Brasil	Livro	Origem da heparina
SILVA et al., 2018	<i>Legislação brasileira aplicada à produção do insumo farmacêutico ativo heparina</i>	Brasil	Legislação	Origem e Obtenção da Heparina
Mesquita, A. C. T. 2016	<i>Avaliação e otimização de metodologia turbidimétrica para a quantificação de heparina de baixo</i>	Brasil	Artigo Original	Origem da Heparina

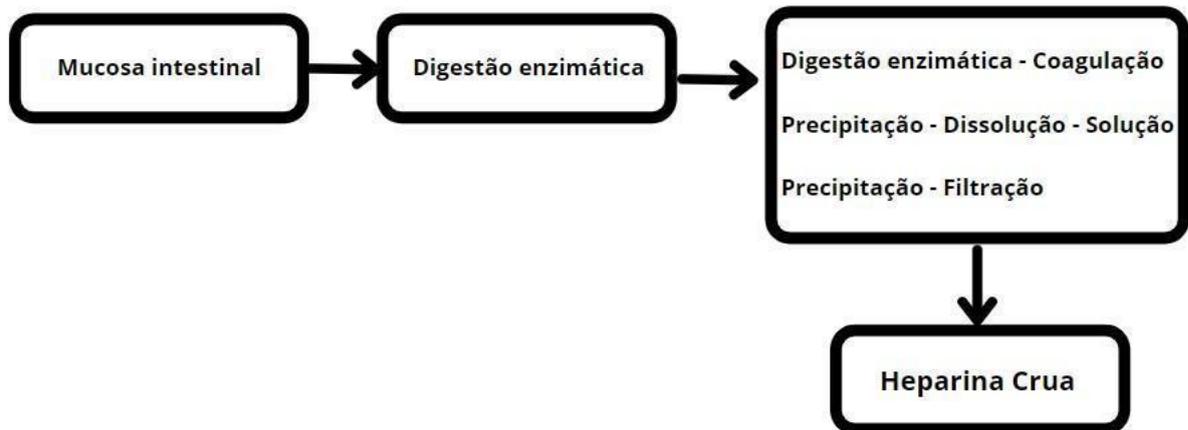
4.3 Obtenção da heparina

No Brasil, a regulamentação para a produção da heparina é regulamentada por meio das seguintes legislações Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 69/2014 que regulamentam as Boas Práticas de Fabricação (BPF) de Insumos Farmacêuticos Ativos (IFAs) (BRASIL, 2014) e a RDC nº 55/2010 que dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos (BRASIL, 2010).

A produção de heparina é restrita, pois sua matéria-prima básica são os tecidos de animais. E diferentes tecidos de espécies distintas de mamíferos já estiveram presentes na fabricação de heparina para fins farmacêuticos ao longo dos anos, sendo originários de fígado de cão, pulmão bovino e do intestino suíno (TOVAR *et al.*, 2016).

A heparina *in natura* é extraída e isolada nas células mastócitos dos tecidos conectivos da mucosa intestinal de suínos, e em pequena quantidade do tecido pulmonar bovino (SILVA *et al.*, 2018), também é encontrada na camada celular endotelial e no plasma sanguíneo (MAJERUS *et al.*, 1991). No processo de isolamento observa-se a hidrólise da mucosa e em seguida a extração de heparina, que aquece enzimas proteolíticas, após esse processo ocorre a adsorção dos poliânions sulfatados para uma resina de troca iônica (Figura 2). As cadeias glicosaminoglicanas se degradam gradativamente, gerando uma combinação de diferentes fragmentos com diversas massas moleculares e funções biológicas (SILVA *et al.*, 2018).

Figura 2: Fluxograma de produção da heparina a partir da mucosa bovina ou suína



Fonte: Adaptado de SILVA *et al.*, 2018

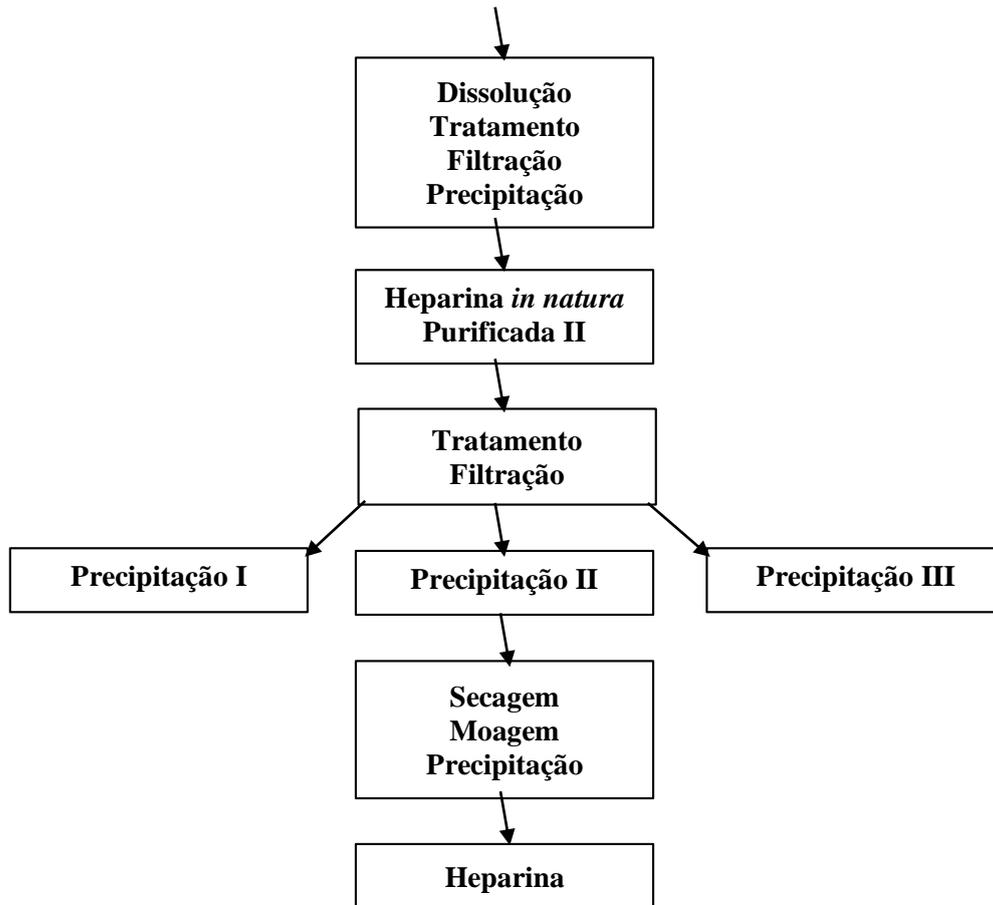
Para a obtenção da heparina, a empresa deve ter controles para a garantia da qualidade do material obtido, dessa forma cumprindo com as exigências estabelecidas na legislação referente a BPF, conforme prescrito no Art. 4º da RDC nº 69/2014 onde o responsável pela fabricação de insumos farmacêuticos ativos tem como objetivo assegurar os requisitos de qualidade e pureza sejam cumpridos (BRASIL, 2014).

Após obtenção da heparina *in natura* é feito o processo de produção do insumo da heparina (Figura 3). Assim a legislação possui algumas exigências, que estão descritas no Art. 6º da RDC nº 69/2014. Dentre esses parâmetros analisados durante o processo da purificação de Heparina *in natura*, podemos citar: inativação viral, por meio do controle do pH; Oxidação por permanganato de potássio, através do controle de temperatura; oxidação por peróxido de oxigênio, através do controle da temperatura, dentre outros (SILVA *et al.*, 2018).

Muitos esforços são realizados no intuito de elaborar técnicas que sejam seguras e eficazes na quantificação dessas biomacromoléculas. Dessa forma, várias metodologias, biológicas ou químicas, são propostas a fim de determinar quantitativamente e qualitativamente as heparinas em fluidos biológicos (MESQUITA, 2016).

Figura 3: Fluxograma de Produção de Heparina a partir da heparina *in natura*

Heparina



Fonte: Adaptado de SILVA *et al.*, 2018

4.4 Métodos analíticos para quantificação da heparina

Diferentes métodos analíticos vêm sendo desenvolvidos na avaliação e quantificação de glicosaminoglicanas, como a heparinas. Mas os estudos são dirigidos para a determinação das diversas sequências sacarídicas que constituem a molécula e utilizam técnicas como ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e sistemas eletroforéticos (PATEL *et al.*, 2008; MOURIER; VISKOV, 2004). Mas poucos métodos estão disponíveis para a quantificação de enoxaparina sódica isolada, em combinação com outros fármacos ou em sua forma farmacêutica (SAHU; LARIYA, 2019).

4.4.1 Método turbidimétrico

A turbidimetria é uma técnica que está sendo amplamente utilizada na quantificação da heparina, e está relacionada à colorimetria, que é a capacidade de

medir a turbidez de uma amostra, possuindo aplicação restrita à quantificação de substâncias que podem ser precipitadas, usando reagentes apropriados e em condições que comprovem a formação de uma suspensão suficientemente estável para se obter reprodutibilidade (OLIVEIRA, 2009).

Algumas das vantagens deste método consistem na sua facilidade na hora da execução por ser simples e rápido. Porém esta técnica sofre interferências que podem influenciar diretamente na resposta analítica, como o pH, temperatura, tempo do meio reacional da solução e o tamanho das partículas dispersas. E na quantificação das HBPM a utilização deste método turbidimétrico limita-se às condições reacionais de 37°C, pH de 4,4 e tempo de reação de 1 hora (MESQUITA, 2016).

4.4.2 Método cromatográfico

Na cromatografia de exclusão de tamanho é utilizado o índice de refração, para determinar o peso molecular de heparinas não fracionadas (HNF) e heparinas de baixo peso molecular (HBPM), porém, de modo geral, mostram um desempenho diferente nas colunas e nos tempos de retenção da HNF ou HBPM variam. Os padrões de peso molecular usados têm diferentes conformações em solução e exibiram interações de coluna diferentes de HNF e HBPM, levando a resultados imprecisos (OUYANG *et al.*, 2017).

A cromatografia líquida com espectrometria de massa tem sido usada para traçar o perfil de preparações de heparina, porém medir distribuições completas do peso molecular para HNF ou HBPM por este método não é satisfatório, e o problema surge da heterogeneidade da sequência da heparina. Pois os métodos espectrométricos de massa mais modernos são limitados a oligossacarídeos curtos, mesmo a heparina não sendo um peptídeo (MULLOY *et al.*, 2014).

Foi descrito em um estudo por Tovar *et al.*, 2016 sobre a análise das propriedades em 361 amostras de heparinas de diferentes origens, sendo, 150 amostras de heparina vinda de mucosa intestinal de porcos, 210 vindas de mucosa intestinal de bovinos, e 1 amostra de pulmão bovino por cromatografia de troca aniônica. Tiveram de resultado que os diferentes tipos de heparina possuem propriedades iônicas diferentes por apresentarem diferentes proporções e por serem de diferentes origens. Além disso, mostraram que apesar da semelhança estrutural, as heparinas podem possuir atividades anticoagulantes não idênticas.

4.4.3 Método espectrofotométrico

O método espectrofotométrico UV foi desenvolvido para a análise de enoxaparina sódica, e apresentou ser simples, rápido, exato, preciso, reproduzível se tornando aplicável com sucesso à formulação farmacêutica sem interferência de excipientes e sendo usado para análise de controle de qualidade de rotina da formulação com enoxaparina sódica (CHENGALVA; GUNDALA, 2017). Ademais, o método por espectrofotometria UV possui um baixo custo e economia de tempo em comparação com o método HPLC de análise (SAHU; LARIYA, 2019).

Para o ensaio espectrofotométrico da heparina cálcica, é necessário para a análise das amostras, utilizar um espectrômetro de ressonância magnética nuclear, com mais de 500 MHz e 16 scans em pulso de 90°, com temperatura constante de 25 °C e janela espectral de 10 a -2 ppm. No entanto, para analisar amostras de heparina sódica bovina, utiliza-se o mesmo equipamento e janela espectral, porém, com condições de temperatura diferentes, sendo 35°C constantes (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na quantificação da heparina é possível notar que os métodos existentes e de fácil acesso são escassos, podendo concluir que dos diferentes métodos analíticos descritos na literatura sobre a quantificação da heparina, o método que mais apresenta resultados é o de turbidimetria e espectrofotometria, e que mais estudos devem ser realizados sobre essa abordagem.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. Diário Oficial da União 2010.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC. N. 69 de 8 de Dezembro de 2014. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos. Diário Oficial da União 2014.

BAYTAS, S. N.; LINHARDT, R. J. Advances in the preparation and synthesis of heparin and related products. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 12, p. 2095-2109, 2020.

BRITO, A. S. *et al.* Anti-IIa activity and antitumor properties of a hybrid heparin / heparan sulfate-like compound from *Litopenaeus vannamei* shrimp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.118, n.1, p.1470–1478, 2018.

CHENGALVA, P.; GUNDALA, A. Development and validation of UV spectrometric method for quantitative determination of enoxaparin sodium in bulk and injectable. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 16, p. 1517-1523, 2017.

DA SILVA, Eva Elisângela Borges et al. LEGISLAÇÃO BRASILEIRA APLICADA À PRODUÇÃO DO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO HEPARINA. *Visão Acadêmica*, v. 19, n. 1, 2018.

FARMACOPEIA BRASILEIRA **Agência Nacional de Vigilância Sanitária -Anvisa 6ª EDIÇÃO K**, 2019. [s.l.: s.n., s.d.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>>. Acesso em: 04 mar. De 2022.

LARA, A. S. **Trombocitopenia induzida por heparina**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialista em hematologia e banco de sangue) – Academia de Ciência e

Tecnologia de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2020.

LARANJEIRA, M. C. M.; COELHO, T. C. **Síntese e Caracterização da heparina de massa molar**. 2002. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MAJERUS, P. W. et al, Medicamentos Anticoagulantes, Antitrobóticos e Trombolíticos, In: GOODMAN & GILMAN, As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 8. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1991.

MARROTA-OLIVEIRA, S. S.; MARCHETTI, J. M. Determinação da heparina fracionada em preparações farmacêuticas utilizando turbidimetria. **Quim. Nova**, n.34, v.6, p. 1063-1067, 2011.

MEDEIROS, L. H. C. **Avaliação do potencial antioxidante de Condroitim sulfato extraído das vísceras de tilápia *Oreochromis niloticus***. 2020. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020.

MESQUITA, A. C. T. **Avaliação e otimização de metodologia turbidimétrica para a quantificação de heparina de baixo peso molecular utilizando planejamento de experimentos**. 2016. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

MOURIER, P. A. J.; VISKOV, C. Chromatographic analysis and sequencing approach of heparin oligosaccharides using cetyltrimethylammonium dynamically coated stationary phases. **Analytical biochemistry**, v. 332, n. 2, p. 299-313, 2004.

MULLOY, B. *et al.* Pharmacology of Heparin and Related Drugs. **Pharmacol. Rev.** v. 68, n. 1, p. 76–141, 2016.

MULLOY, B. *et al.* USP compendial methods for analysis of heparin: chromatographic determination of molecular weight distributions for heparin sodium. **Anal Bioanal Chem**, v. 1, n. 406, p. 4815–4823, 2014.

OLIVEIRA, S. S. M. **Preparação e caracterização in vitro de micropartículas de heparina fracionada potencialmente aplicáveis ao tratamento da trombose venosa profunda**. 2009. (Tese de Doutorado) - Universidade de São Paulo, Rio Preto, 2009.

OUYANG, Y. *et al.* Qualitative and quantitative analysis of heparin and low molecular weight heparins using size exclusion chromatography with multiple angle laser scattering/refractive index and inductively coupled plasma/mass spectrometry detectors. **Journal of Chromatography A**, v. 1522, n. 1, p. 56-61, 2017.

PATEL, R. P. *et al.* A simple capillary electrophoresis method for the rapid separation and determination of intact low molecular weight and unfractionated heparins. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 46, n. 1, p. 30-35, 2008.

PERES, D. S. L. **Anticoagulantes orais: velho versus novo**. 2015. (Tese de Doutorado) - Universidade do Algarve, Faro, 2015.

SAHU, S.; LARIYA, N. K. Development and Validation of Spectrophotometric Method for the Estimation of Enoxaparin sodium in marketed formulation. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 4-s, p. 1236-1239, 2019.

TOMA, T. S. *et al.* Heparinas de baixo peso molecular para profilaxia e tratamento de trombose venosa profunda na gravidez. **Avaliação de tecnologias de saúde**. v. 14, n. 2, p. 229-236, 2013.

TOVAR, A. M. F. *et al.* Structural and haemostatic features of pharmaceutical heparins from different animal sources: challenges to define thresholds separating distinct drugs. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.

XU, K.; JIN, L. The role of heparin/heparan sulphate in the IFN- γ -led Arena. **Biochimie**, v. 170, n. 1, p. 1-9, 2020.

YOSHIDA, W. B. Tratamento convencional da trombose venosa profunda proximal: ainda uma boa opção?. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 15, n. 1, p. 1-3, 2016.