

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

Andreza da Costa de Santana

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS APRESENTAÇÕES DE HEPARINA
DISPONÍVEIS NO MERCADO NACIONAL**

Rio de Janeiro

2018

Andreza da Costa de Santana

AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS APRESENTAÇÕES DE HEPARINA
DISPONÍVEIS NO MERCADO NACIONAL

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Doutora Silvana do Couto Jacob.
Colaboradoras: Doutora Claudia Maria da Conceição e Mestre Anna Carolina Machado Marinho.

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

de Santana, Andreza da Costa

AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS APRESENTAÇÕES DE
HEPARINA DISPONÍVEIS NO MERCADO NACIONAL. / Andreza da
Costa de Santana. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.

138 f. : il. ; fig. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa
de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

Orientadora: Silvana do Couto Jacob.

1. Heparina. 2. Controle de Qualidade. 3. Cromatografia Líquida. 4.
Espectroscopia de Prótons por Ressonância Magnética. 5. Estudos de
Validação. I. Título.

PHYSICAL-CHEMICAL EVALUATION OF HEPARIN
PRESENTATIONS AVAILABLE IN THE NATIONAL MARKET.

Andreza da Costa de Santana

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS APRESENTAÇÕES DE HEPARINA
DISPONÍVEIS NO MERCADO NACIONAL**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 27/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Doutor Ivano Raffaele V. de Filippis Capasso
Instituição: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Doutora Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso
Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro

Doutora Paloma Napoleão Pego
Instituição: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

A todos os instantes, a Deus, pela sua infinita misericórdia, por enviar-me espíritos protetores e auxiliares, por me fazer serva do seu amor e me conceder o dom científico em benefício da sociedade.

À minha família por me permitir chegar onde estou por acreditar em mim e em meu potencial. Ana Claudia, obrigada por ser uma mãe amorosa e autoritária, sua força me impulsionou a ser disciplinada. Luiz Alberto, te agradeço por ser um pai amoroso e por me mostrar a vida como ela é, cheia de percalços e armadilhas, mas acima de tudo me mostrar que podemos ser vitoriosos com ética e respeito. Letícia, minha pequena e grande irmã, obrigada por ser minha válvula de escape, me fazer sorrir, quando queria chorar e por ser me ensinar a ser uma irmã e do bem.

Ao meu grande amor, César. Sem você esse percurso seria preto e branco, trouxe cor e som para minha vida, trouxe o sol em meio a tempestades, trouxe o abraço reconfortante em momentos de desespero. Mostrou-me o doce sabor das lutas, oras vitoriosas, oras derrotadas, mas sem deixar o sorriso no canto do rosto e a simpatia de lado.

Aos meus poucos e grandes amigos. Todos foram essenciais na minha caminhada. Marina, obrigada pela preocupação e as doces palavras. Ana Carolina, Karen e Víctor, amigos de IFRJ, vivenciaram e compreenderam perfeitamente o que passei. Ana Beatriz, Debora, Raíssa, Juliana e Patrícia estavam o tempo todo próximas do meu trabalho e aguentaram meus momentos de raiva e desespero, obrigada pela paciência!

Aos meus professores. Agradeço pela paciência, dedicação e conhecimento transpassado. Meus sinceros agradecimentos aos profissionais da educação que não são valorizados como deveriam, mas exercem papéis fundamentais na história de cada indivíduo desde a alfabetização até ao ensino de uma profissão.

À minha orientadora DSc Silvana Jacob. Obrigada por me aceitar como sua aluna e contribuir para o enriquecimento do meu trabalho.

Às minhas colaboradoras/orientadoras Claudia Maria e Anna Carolina. Agradeço pela confiança que sempre depositaram em mim e pela oportunidade de conviver ao lado de vocês. Vocês junto com todos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Produtos Biológicos e Artigos para Saúde são responsáveis pela boa profissional e ótima pessoa que sou hoje. Obrigada!

Lembremo-nos de que o homem interior se renova sempre. A luta enriquece-o de experiência, a dor aprimora-lhe as emoções e o sacrifício tempera-lhe o caráter.

Chico Xavier

RESUMO

A heparina é um polissacarídeo oriundo da mucosa intestinal de suínos ou do tecido pulmonar bovino, indicada há mais de seis décadas como anticoagulante e antitrombótico. Foi descoberta por McLean ao isolá-la de um extrato de tecido de cães, e posteriormente, Howell e Holt batizaram-na de heparina em virtude de ser isolada primeiramente no fígado. Nos anos de 2007 e 2008, lotes contendo alto teor de dermatan sulfato (DS) e condroitina supersulfatada (OSCS) causaram eventos adversos a pacientes. Na década de 1980, surgiram no cenário científico as heparinas de baixa massa molar, resultante do fracionamento da heparina suína, com o objetivo de produzir agentes anticoagulantes mais eficazes e seguros, no entanto, a comercialização da heparina não fracionada acontece até os dias de hoje. Atualmente, os compêndios oficiais priorizam ensaios físico-químicos à matéria prima de heparina sódica e cálcica não sendo preconizado nenhum ensaio que permita avaliar impurezas e contaminantes no produto acabado. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar métodos cromatográficos para identificar e quantificar relativamente impurezas na heparina sódica suína em preparações injetáveis. Foi desenvolvido protocolo de preparo de amostra através do estudo da dessalinização com a coluna HiTrap™, o ultra-filtro de microcon® e a coluna Bio Rad® para avaliação qualitativa de heparina por meio de método cromatográfica. Os métodos cromatográficos de identificação e quantificação relativa foram desenvolvidos e validados. Foi avaliada a confiabilidade do método qualitativa desenvolvida por comparação dos resultados obtidos com aqueles provenientes da RMN H¹. Os resultados obtidos demonstraram que o protocolo de dessalinização com a coluna Micro Bio Spin® foi o mais eficiente, pois não houve perda de massa na avaliação pelo método cromatográfico de identificação. O ensaio cromatográfico qualitativo foi validado pelo parâmetro seletividade, apresentando resultados satisfatórios. A análise das amostras por este método mostrou que entre sete amostras, três apresentavam DS em sua composição. Esse resultado foi confrontado com a RMN H¹, a qual mostrou sinal de deslocamento de DS em todas as preparações, sendo a amostra 2 com maior intensidade. O método cromatográfico de ensaio limite mostrou boa seletividade e LD para galactosamina de 0,03 mg/mL e para glicosamina 0,03 mg/mL, a análise das sete amostras mostrou detecção de galactosamina apenas na amostra 2, com teor de 0,12% de

galactosamina em relação a glicosamina contida na preparação. Esta amostra está aprovada para uso, pois o resultado está abaixo do limite de 1% de galactosamina em relação às hexosaminas totais. Acredita-se que a ausência de detecção da galactosamina nas duas amostras restantes esteja associada a concentrações inferiores a 0,03 mg/mL de DS nas preparações e/ou ao desgaste do eletrodo do detector. Os resultados obtidos pelos dois métodos cromatográficos complementam-se e promovem uma ampla análise das preparações injetáveis de heparina sódica suína. Sendo considerados simples e econômicos, os métodos já validados serão implementados na rotina laboratorial e serão sugeridos para a farmacopeia brasileira como métodos físico-químicas para preparações injetáveis de heparina sódica suína.

Palavras-chave: Heparina. Controle de Qualidade. Cromatografia Líquida. Espectroscopia de Prótons por Ressonância Magnética. Estudos de Validação.

ABSTRACT

Heparin is a polysaccharide derived from the intestinal mucosa of porcine or bovine lung tissue, indicated for more than six decades as anticoagulant and antithrombotic. It was discovered by McLean in isolating it from a dog tissue extract, and later Howell and Holt named it as heparin because it was first isolated in the liver. In the years 2007 and 2008, lots containing high content of dermatan sulfate (DS) and supersulfated chondroetin (OSCS) caused adverse events to patients. In the 1980s, low-molecular-weight heparins resulting from the fractionation of porcine heparin appeared in the scientific scenario with the objective of producing more effective and safe anticoagulant agents, however, the commercialization of unfractionated heparin happens until the present day. Currently, the official compendiums prioritize physical-chemical tests on the raw material of sodium and calcium heparin, and no tests are recommended to evaluate impurities and contaminants in the finished product. Thus, the objective of this work was to develop and validate chromatographic methods to identify and quantify relatively impurities in heparin sodium in injectable preparations. Sample preparation protocol was developed through the study of desalination with the HiTrap™ column, the microcon® ultrafilter and the Bio Rad® column for the qualitative evaluation of heparin by means of a chromatographic method. The chromatographic methods of identification and relative quantification were developed and validated. The reliability of the qualitative method developed by comparing the results obtained with those from the H1 NMR was evaluated. The results showed that the desalination protocol with the Micro Bio Spin column was the most efficient, since there was no loss of mass in the evaluation by the chromatographic method of identification. The qualitative chromatographic assay was validated by the parameter selectivity, presenting satisfactory results. Analysis of the samples by this method showed that among seven samples, three had DS in their composition. This result was compared to the H1 NMR, which showed a DS shift signal in all the preparations, with sample 2 having the highest intensity. The chromatographic limit test method showed good selectivity and LD for galactosamine of 0.03 mg / mL and for glucosamine 0.03 mg / mL, analysis of the seven samples showed detection of galactosamine only in sample 2, with a content of 0.12 % of galactosamine relative to the glycosamine contained in the preparation. This sample is approved for use as the result is below the 1% limit of galactosamine relative to total hexosamines. The

absence of galactosamine detection in the two remaining samples is believed to be associated with concentrations less than 0.03 mg / mL of DS in the preparations and / or wear of the detector electrode. The results obtained by the two chromatographic methods complement and promote a broad analysis of injectable preparations of porcine sodium heparin. If considered to be simple and economical, the already validated methods will be implemented in the laboratory routine and will be suggested for the Brazilian pharmacopoeia as physical-chemical methods for injectable preparations of porcine sodium heparin.

Keywords: Heparin. Quality control. Chromatography, Liquid. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. Validation Studies.

LISTA DE SIGLAS

A1	Sinal de deslocamento em 5,42 ppm referente a proporção GlcNAC/GlcNS
A2	Sinal de deslocamento em 3,28 ppm do próton de GlcNS ou GlcNS (6S)
A1-G	Sinal de deslocamento em 5,57 ppm referente ao próton anomérico das espécies GlcNS (6S) ligadas a GlcA
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
As	Fator de simetria de pico
AT	Antitrombina III
CEC	Circulação extracorpórea
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMED	Câmara de Medicamentos
CIT	Comissão Intergestores Tripartide
CBAF	Componente Básico da Assistência Farmacêutica
D1	Sinal de deslocamento em 5,52 ppm referente ao próton do monômero GlcNS (3,6S)
DAD	Arranjo de fotodiodos
DPA	Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de detecção.
DS	Dermatan Sulfato
DQ	Departamento de química
EC	Eletroforese capilar
EMA	<i>European Medicines Agency</i> . Tradução Livre: Agência Europeia de Medicamentos
f	Distância perpendicular entre a linha vertical do sinal máximo e a borda do sinal cromatográfico, esta distância é medida no ponto 5% da altura do pico a partir da linha de base
FII	Fator Protrombina, encontrado no fígado, sua forma ativada é IIa
FV	Fator Pró-acelerina, encontrado no fígado, sua forma ativada é Va

FVII	Fator Pró-convertina, encontrado no fígado, sua forma ativada é VIIa
FVIII	Fator anti-hemofílico, encontrado no endotélio, sua forma ativada é VIIIa
FIX	Fator Christmas, encontrado no fígado, sua forma ativada é IXa
FX	Fator de Stuart, encontrado no fígado, sua forma ativada é Xa
FXI	Fator Pró-transglutaminase, encontrado no fígado, sua forma ativada é XIa
FXII	Fator antecedente da tromboplastina, encontrado no fígado, sua forma ativada é XIIa
FT	Fator Tecidual
FvW	Fator de von Willebrand
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> . Tradução Livre: Administração de alimentos e drogas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GAG _(s)	Glicosaminoglicano(s)
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GalNAc (2S)	N-acetilgalactosamina com grupo sulfato no carbono 2
GalNAc (4/6S)	N-acetilgalactosamina com grupo sulfato nos carbonos 4 ou 6
GlcA	β -D-ácido glicurônico
GlcA(2S)	β -D-ácido glicurônico 2-O-sulfatado
GlcNAc	β -D-glicosamina N-acetilada
GlcNAc (6S)	β -D-glicosamina N-acetilada O-sulfatada
GlcNS	β -D-glicosamina N-sulfatada
GlcNS (3,6S)	β -D-glicosamina N-sulfatada O-sulfatada 3-sulfatada
GlcNS (6S)	β -D-glicosamina N-sulfatada O-sulfatada
HBMM	Heparina de baixa massa molar
Hep	Heparina não fracionada ou heparina convencional
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
I 1	Sinal de deslocamento em 5,21ppm referente ao próton de Id (2S)
I 1 (des)-A	Sinal de deslocamento em 5,02 ppm referente ao próton H1 das unidades de IdoA não sulfatadas
IC	Inclinação da curva analítica

ICP	Espectrometria de emissão óptica com plasma
IdoA	α -L-ácido idurônico
Ido (2S)	α -L-ácido idurônico 2-O-sulfatada
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LBAIS	Laboratório de Biológicos, Artigos e Insumos da Saúde
LD	Limite de detecção
MMCO	Massa Molar de Corte
N	Número de pratos teóricos
OSCS	Condroetina Supersulfatada
PA	Princípio Ativo
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN C ¹³	Ressonância Magnética Nuclear por prótons C ¹³
RMN H ¹	Ressonância Magnética Nuclear por prótons H ¹
SBCCV	Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular
SC	Sulfato de Condroetina
S-GlcNS (3S)	β -D-glicosamina N-sulfatado 3-sulfatado
TF	Transformação de Fourier
TIH	Trombocitopenia induzida por heparina
TR	Tempo de Retenção
TRr	Tempo de Retenção Relativo
TSP	Trimetilsililpropiónico
UV	Ultravioleta
USP	<i>United State Pharmacopoeia</i> . Tradução livre: Farmacopeia Americana
W	Largura da base
W _{0,05}	Largura do pico a 5% da altura

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação (1) Fórmula de resolução.....	49
Equação (2) Fórmula de desvio padrão relativo.....	50
Equação (3) Fórmula de eficiência ou número de pratos teóricos.....	50
Equação (4) Fórmula do fator de simetria do pico.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos proteoglicanos _____	25
Figura 2 - (A) Glicosamina (B) Galactosamina, onde o nitrogênio ligado ao carbono 2, pode ter substituição de um grupamento acetil ou sulfato _____	26
Figura 3 - (A) Ácido glicurônico; (B) Ácido idurônico _____	26
Figura 4 - Estruturas químicas dos principais glicosaminoglicanos: (a) sulfato de condroitina [R1 – R4 = não substituído ou sulfatado], (b) dermatan sulfato, (c) heparina, (d) sulfato de heparan e (e) keratan sulfato. _____	27
Figura 5 - Blocos de construção de monossacarídeos de heparina. _____	28
Figura 6 - Estruturas moleculares de Fondaparinux sódica (A); Enoxaparina Sódica (B) e Dalteparina Sódica (C). _____	32
Figura 7 - Esquema da cascata de coagulação clássica. _____	33
Figura 8 - Modelo de cascata de coagulação com base nas superfícies celulares. _____	35
Figura 9 - Sequência de pentassacarídeos que promovem ligação específica à ATIII. _____	37
Figura 10 - Representação cristalográfica do complexo entre ATIII, trombina e heparina. _____	37
Figura 11 - Mecanismo de ação da Heparina não fracionada e da Heparina de baixa massa molar. _____	38
Figura 12 - Fórmula estrutural de OSCS (a) e sulfato de condroitina (b). _____	40
Figura 13 - Demonstração dos parâmetros para determinação da simetria do pico. _____	52
Figura 14 - Sistema montado com a coluna HiTrap™. _____	61
Figura 15 - Etapas de dessalinização com a coluna HiTrap™. _____	61
Figura 16 - Esquema do processo de dessalinização a partir de filtros de Microcon®. _____	62
Figura 17 - Sistema de dessalinização montado composto de eppendorf de 1,5 mL e Microcon® de 0,5 mL, após o processo a amostra fica retida no Microcon® enquanto os sais transpassam o filtro. _____	63
Figura 18 - Sistema de dessalinização pela coluna Micro Bio-Spin® _____	64
Figura 19 - Esquema de dessalinização com coluna Micro Bio-Spin® _____	64
Figura 20 - Esquema do preparo de solução padrão para avaliação do perfil cromatográfico; Preparo da solução de adequação do sistema analítico e; Preparo da amostra para o método de identificação cromatográfica. _____	66

Figura 21 - Condições cromatográficas do método de identificação. _____	67
Figura 22 - Procedimento experimental para validação do método cromatográfico de identificação. _____	68
Figura 23 - Procedimentos experimentais para o método espectrométrico. _____	70
Figura 24 - Procedimento experimental para o preparo de solução de adequação do sistema para o método de ensaio limite. _____	71
Figura 25 - Procedimento experimental para o preparo de solução de branco e amostra para o método de ensaio limite. _____	72
Figura 26 - Procedimento experimental para análise de seletividade do método cromatográfico de ensaio limite _____	76
Figura 27 - Procedimento experimental para análise do LD para o método cromatográfico de ensaio limite. _____	78
Figura 28 - Cromatograma referente a injeção de 10 µL do padrão USP de DS 1 mg/mL nos comprimentos de onda de 202 nm (A), 215 nm (B), 254 nm (C), 276 nm (D). Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____	79
Figura 29 - Cromatograma referente a injeção de 10 µL do padrão USP de Hep 20 mg/mL nos comprimentos de onda de 202 nm (A), 215 nm (B), 254 nm (C), 276 nm (D). Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____	79
Figura 30 - Cromatograma referente a injeção de 10 µL do padrão USP de OSCS 1 mg/mL nos comprimentos de onda de 202 nm (A), 215 nm (B), 254 nm (C), 276 nm (D). Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____	80
Figura 31 - Cromatograma referente à amostra 4 testada com o procedimento da coluna HiTrap™. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____	82
Figura 32 - Cromatograma do padrão de heparina sem tratamento. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos,	

Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____ 83

Figura 33 - Cromatograma do padrão de heparina submetido a dessalinização pelo protocolo do ultra-filtro de Microcon(R) lavado uma vez. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min_84

Figura 34 - Cromatograma da amostra 4 submetida a dessalinização pelo protocolo do ultra-filtro de Microcon(R) lavada uma vez. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____ 84

Figura 35 - Cromatograma da amostra 4 submetida a dessalinização pelo protocolo do ultra-filtro de Microcon(R) lavada duas vezes. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____ 84

Figura 36 - Cromatograma da amostra 4 submetida a dessalinização pelo protocolo do ultra-filtro de Microcon(R) lavada cinco vezes, Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. 85

Figura 37 - Gráfico do estudo das etapas de lavagem da Amostra 4 com o ultra filtro de Microcon®. _____ 86

Figura 38 - Cromatograma do padrão de heparina sem tratamento. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____ 88

Figura 39 - Cromatograma do padrão de heparina submetido a dessalinização pelo protocolo da coluna Micro Bio Spin®. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____ 88

Figura 40 - Cromatograma da amostra 4 submetida a dessalinização pelo protocolo da coluna Micro Bio Spin®. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____ 88

Figura 41 - Gráfico da área do sinais cromatográficos de Hep no padrão e na amostra no estudo da dessalinização utilizando a coluna Micro Bio Spin®. _____90

Figura 42 - Cromatograma da solução de adequação do sistema contendo 10 mg/mL de padrão USP de DS, 20 mg/mL de padrão USP de Hep e 10 mg/mL de padrão USP de OSCS. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____92

Figura 43 - Cromatogramas dos resultados para o parâmetro seletividade, onde (A) Branco; (B) Padrão; (C) Amostra 20 mg/mL, sem adição padrão; (D) Amostra 20 mg/mL com adição de padrão de heparina 2,5 mg/mL; (E) Amostra 20 mg/mL com adição de padrão de DS 1,25 mg/mL. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____95

Figura 44 - Cromatograma da Amostra 1. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____97

Figura 45 - Cromatograma da Amostra 2. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____98

Figura 46 - Cromatograma da Amostra 3. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____98

Figura 47 - Cromatograma da Amostra 4. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____98

Figura 48 - Cromatograma da amostra 5. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____99

Figura 49 - Cromatograma da amostra 6. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____100

Figura 50 - Cromatograma da amostra 7. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min. _____	100
Figura 51 - Espectro de RMN do padrão USP de Heparina. _____	102
Figura 52 - Espectro de RMN do padrão USP de DS. _____	103
Figura 53 - Espectro de RMN do padrão USP de OSCS. _____	104
Figura 54 - Espectros do padrão de Hep (A) e da amostra 2 (B) com uma janela espectral de 0 a 7,50 ppm. _____	105
Figura 55 - Espectro de padrão de Hep (A) e amostra 2 (B) com uma janela espectral de 4,90 a 5,60 ppm. _____	106
Figura 56 - Estrutura molecular do Tris(hidroximetil)aminometano. _____	107
Figura 57 - Cromatograma da solução de adequação do sistema do método da THE UNITED (2016), com o uso da pré-coluna Aminotrap (A) e sem o uso da pré-coluna Aminotrap (B). Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detecção amperométrica pulsada, Fluxo: 0,5 mL/ min; Volume de injeção: 10 µL, tempo de corrida: 10 min. _____	111
Figura 58 - Cromatograma da solução de padrão de 0,06 mg/mL galactosamina e 0,98 mg/mL de glicosamina em HCl 5N. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detecção amperométrica pulsada, Fluxo: 1,0 mL/ min; Volume de injeção: 5 µL, tempo de corrida: 11 min. _____	113
Figura 59 - Cromatograma dos resultados do parâmetro seletividade, onde (A) Branco; (B) Solução padrão de galactosamina 0,20 mg/mL e de glicosamina 0,98 mg/mL;; (C) Enoxaparina sódica 2,0 mg/mL sem adição padrão; (D) Enoxaparina sódica 2,0 mg/mL com adição padrão de galactosamina 0,20 mg/mL. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detecção amperométrica pulsada, Fluxo: 1,0 mL/ min; Volume de injeção: 5 µL, tempo de corrida: 11 min. _____	116
Figura 60 - Cromatogramas das soluções padrão de galactosamina e glicosamina na concentração de 0,80 e 0,98 mg/mL (A); 0,40 e 0,49 mg/mL (B); 0,20 e 0,25 mg/mL (C); 0,10 e 0,13 mg/mL (D); 0,05 e 0,06 mg/mL (E); 0,03 e 0,03 mg/mL (F); 0,01 mg/mL e 0,02 mg/mL (G). Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detecção amperométrica pulsada, Fluxo: 1,0 mL/ min; Volume de injeção: 5 µL, tempo de corrida: 11 min. _____	118

Figura 61 - Comparação entre (A) Padrão de 0,40 mg/mL de galactosamina e 0,49 mg/mL de glicosamina; (B) Amostra 1; (C) Amostra 2; (D) Amostra 3; (E) Amostra 4; (F) Amostra 5; (G) Amostra 6; (H) Amostra 7. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detecção amperométrica pulsada, Fluxo: 1,0 mL/ min; Volume de injeção: 5 μ L, tempo de corrida: 11 min. _____ 120

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios de aceitabilidade para os parâmetros de adequação da separação cromatográfica.....	49
Quadro 2 - Parâmetros de validação para cada metodologia cromatográfica avaliada.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das amostras de hep adquiridas para o estudo.	60
Tabela 2 - Eluição programada por gradiente.	67
Tabela 3 - Condições espectrométricas baseadas na Farmacopeia Americana (THE UNITED, 2016g).	70
Tabela 4 - Programação da célula amperométrica de prata/ouro específica para polissacarídeos.	73
Tabela 5 - Programação da eluição.	74
Tabela 6 - Programação da célula amperométrica de prata/ouro específica para polissacarídeos.	75
Tabela 7: Diferenças entre os métodos de ensaio limite.	75
Tabela 8 - Soluções preparadas de padrão de galactosamina e glicosamina.	78
Tabela 9 - Resultados de tempo de retenção do ensaio de adequação do sistema para as substâncias DS, Hep e OSCS.	93
Tabela 10 - Resultados de resolução das seis injeções da solução de adequação do sistema.	94
Tabela 11 - Resultados do ensaio de seletividade.	96
Tabela 12 - Resultados de RMN encontrado para as amostras.	108
Tabela 13 - Principais diferenças entre os métodos de ensaio limite para matéria-prima de heparina sódica.	110
Tabela 14 - Avaliação do perfil cromatográfico com presença e ausência da pré-coluna Aminotrap.	112
Tabela 15 - Resultado dos parâmetros de adequação do sistema para o método de limite de galactosamina em hexosaminas totais.	114
Tabela 16 - Resultados dos tempos de retenção para análise do parâmetro seletividade.	117
Tabela 17 - Área [nC] do sinal-ruído e dos sinais de padrão de galactosamina e glicosamina.	119

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	Heparina: da descoberta à sua ascensão no mercado	24
1.2	Características físico-químicas dos glicosaminoglicanos lineares	24
1.3	Estrutura do SC e DS	27
1.4	Estrutura da heparina	28
1.5	Heparina bovina e suína	29
1.6	Heparina de baixa massa molar	30
1.7	Modelo de cascata de coagulação baseado em superfícies celulares	33
1.8	Atuação fisiológica da heparina	36
1.9	Crise clínica e farmacêutica causada pela heparina	39
1.10	A heparina e a vigilância sanitária	41
1.11	Estado da arte de heparina	42
1.12	A análise físico-química de heparina sódica suína a partir de cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica	45
1.12.1	Adequação do sistema cromatográfico por CLAE	49
1.12.1.1	Resolução (Rs)	50
1.12.1.2	Desvio padrão relativo	50
1.12.1.3	Eficiência ou número de pratos teóricos (N)	51
1.12.2	Validação do método analítico	52
1.12.2.1	Seletividade	53
1.12.2.7	Limite de detecção (LD)	54
1.13	A técnica de ressonância magnética nuclear H ¹ e sua contribuição para comprovação da eficiência do método cromatográfico de identificação	54
2	OBJETIVO	57
2.1	Objetivo geral	57
2.2	Objetivos específicos	57
3	MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1	Equipamentos	58
3.2	Materiais	58
3.3	Padrões e reagentes	59
3.4	Amostras	59
3.4.1	Desenvolvimento de protocolo de dessalinização de amostra	60

3.4.1.1	Protocolo de dessalinização com a coluna HiTrap™	60
3.4.1.2	Protocolo de dessalinização com o ultra filtro Microcon®	62
3.4.1.3	Protocolo de dessalinização com a coluna Bio Spin®	63
3.5	Método cromatográfico para identificação de heparina, dermatan sulfato e condroitina supersulfatada em formulações de heparina sódica suína	65
3.5.1	Perfil cromatográfico de DS, Hep e OSCS	65
3.5.2	Preparo de solução de adequação do sistema	65
3.5.3	Protocolo de preparo da amostra com procedimento da coluna Micro Bio-Spin®	65
3.5.4	Condições Cromatográficas baseadas na Farmacopeia americana (THE UNITED, 2012)	66
3.5.5	Seletividade	68
3.6	Método para identificação de heparina, dermatan sulfato e condroitina supersulfatada em formulações de heparina sódica suína a partir da ressonância magnética nuclear	69
3.6.1	Preparo de Solução Padrão	69
3.6.2	Preparo de Soluções Amostra e Branco	69
3.6.3	Condições Espectrométricas	70
3.7	Método para a determinação do limite de galactosamina em hexosaminas totais presentes em formulações de heparina sódica suína	71
3.7.1	Preparo de solução de adequação do sistema	71
3.7.2	Protocolo de preparo da amostra com procedimento da coluna Micro Bio-Spin®	72
3.7.3	Condições Cromatográficas baseadas na Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016)	73
3.7.4	Condições Cromatográficas baseadas no trabalho de ITOH (2013)	74
3.7.5	Seletividade	76
3.7.6	Teste de limite de detecção (LD)	77
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1	Método para identificação cromatográfica de heparina, dermatan sulfato e condroitina supersulfatada em formulações de heparina sódica suína	22
4.1.1	Desenvolvimento de protocolo de preparo de amostra para a análise cromatográfica	81
4.1.1.1	Protocolo de preparo de amostra com a coluna HiTrap™	81

4.1.1.2	Protocolo de preparo de amostra com os ultra-filtros de Microcon®	83
4.1.1.3	Protocolo de preparo de amostra com a coluna Micro Bio Spin®.....	87
4.1.2	Resultados da adequação do Sistema Analítico.....	91
4.1.3	Resultados da validação do Método Analítico pelo parâmetro de seletividade	94
4.1.4	Resultados das análises das amostras do produto acabado heparina sódica suína	96
4.2	Método para identificação de heparina, dermatan sulfato e condroetina supersulfatada em formulações de heparina sódica suína a partir da ressonância magnética nuclear H¹.....	101
4.2.1	Resultados das análises das amostras do produto acabado heparina sódica suína	104
4.3	Método para a determinação do limite de galactosamina em hexosaminas totais presentes em formulações de heparina sódica suína	109
4.3.1	Método da Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016g) e método de ITOH (2013).	109
4.3.2	Adequação do Sistema Analítico pelo método da Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016g).....	110
4.3.3	Adequação do Sistema Analítico pelo método de ITOH (2013).....	112
4.3.3.1	Seletividade	115
4.3.3.2	Limite de detecção (LD)	118
4.3.3.3	Resultados das análises das amostras do produto acabado heparina sódica suína	119
5	CONCLUSÃO	123
	REFERÊNCIAS.....	124

1 INTRODUÇÃO

1.1 Heparina: da descoberta à sua ascensão no mercado

A descoberta da heparina, também denominada heparina (Hep) não fracionada foi atribuída a McLean ao isolar uma molécula presente no extrato de tecido de cães, a qual obtinha a capacidade de prolongar o tempo de coagulação do plasma. Mais tarde, Howell e Holt batizaram este extrato de heparina em virtude de ser isolada primeiramente no fígado (FILHO, 2008; NOGUEIRA, 2013).

Na década de 1920 passou a ser comercializada apesar de apresentar efeitos colaterais decorrentes. Moloney e Taylor, na década de 1940, desenvolveram um método de purificação que possibilitou a produção em massa (YATES & RUDD, 2016).

A Hep é utilizada há mais de seis décadas como agente anticoagulante e antitrombótico. Devido à indução do retardamento da coagulação é indicada para patologias com ocorrência de coagulação sanguínea excessiva, na diálise renal e no tratamento da síndrome coronariana aguda, bem como, propiciou o desenvolvimento de cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea e vascular (CATANI, 2001; MELO, 2008; FILHO, 2008; SANTOS, 2014).

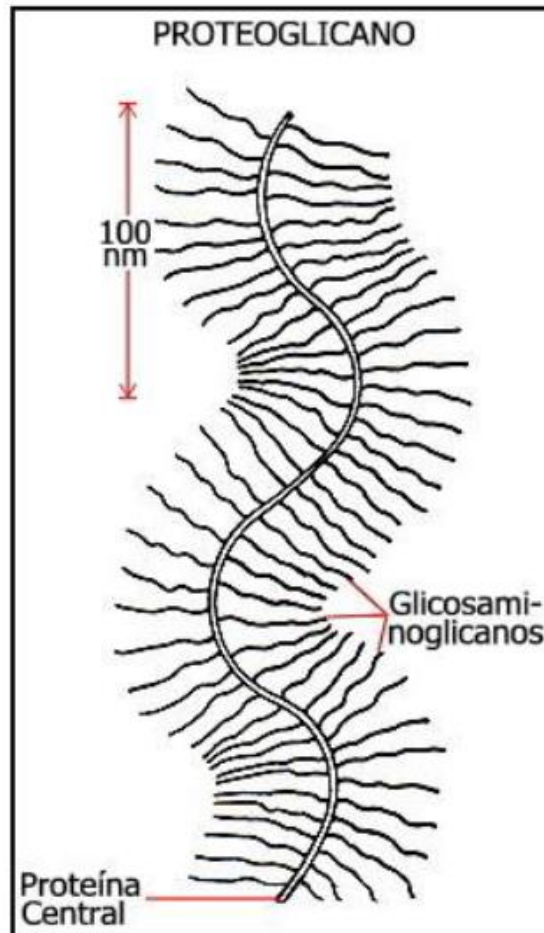
1.2 Características físico-químicas dos glicosaminoglicanos lineares

A Hep faz parte da classe dos glicosaminoglicanos (GAGs) lineares que são polissacarídeos ácidos encontrados na superfície e no interior de células, e na matriz extracelular circundante. Através de sua interação com proteínas, GAGs participam e regulam muitos eventos celulares, bem como processos fisiológicos e fisiopatológicos (WU, 2002).

Os GAGs são expressos em células do tecido conjuntivo e biossintetizados como proteoglicanos (Figura 1), cuja estrutura consiste de um núcleo formado por uma proteína (serglicina) ligada de forma covalente a múltiplas cadeias de glicosaminoglicanos. Após a síntese, as cadeias de heparina são clivadas por liases em pontos aleatórios ao longo das cadeias dando origem a uma mistura polidispersa

armazenada nos mastócitos (CONRAD, 1998, apud RABENSTEIN, 2002; VACCARI, 2003).

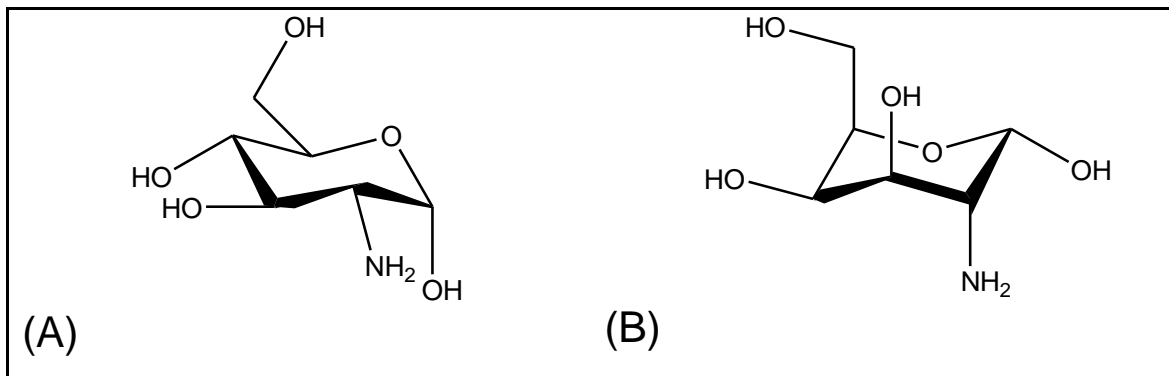
Figura 1 - Estrutura dos proteoglicanos



Fonte: (FRANCO, 2015).

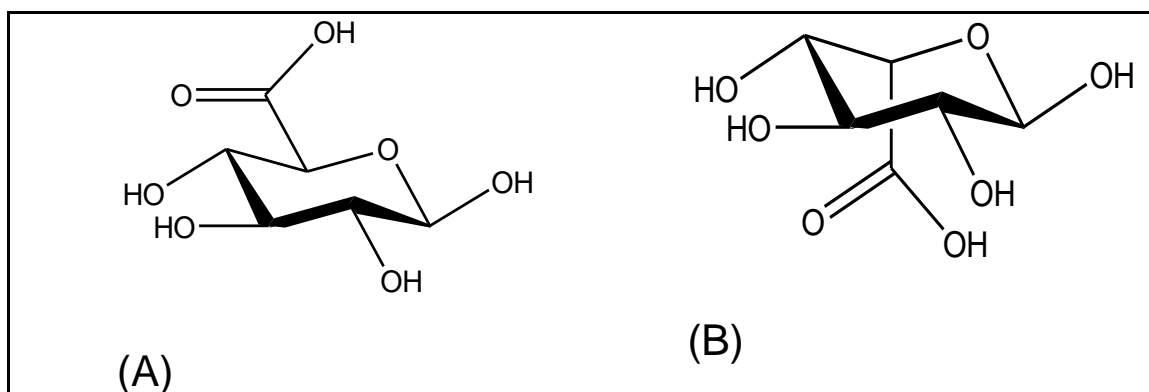
A estrutura molecular dos GAGs é caracterizada por unidades dissacarídicas repetidas contendo monômeros de hexosaminas, como glicosamina ou galactosamina (Figura 2) ligadas ao ácido urônico, usualmente o ácido L-idurônico ou o ácido D-glicorônico (Figura 3). Nos monossacarídeos podem conter, no mínimo, uma carboxila ou sulfato, com carga negativa (COELHO, 2004).

Figura 2 - (A) Glicosamina (B) Galactosamina, onde o nitrogênio ligado ao carbono 2, pode ter substituição de um grupamento acetil ou sulfo



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 3 - (A) Ácido glicurônico; (B) Ácido idurônico



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

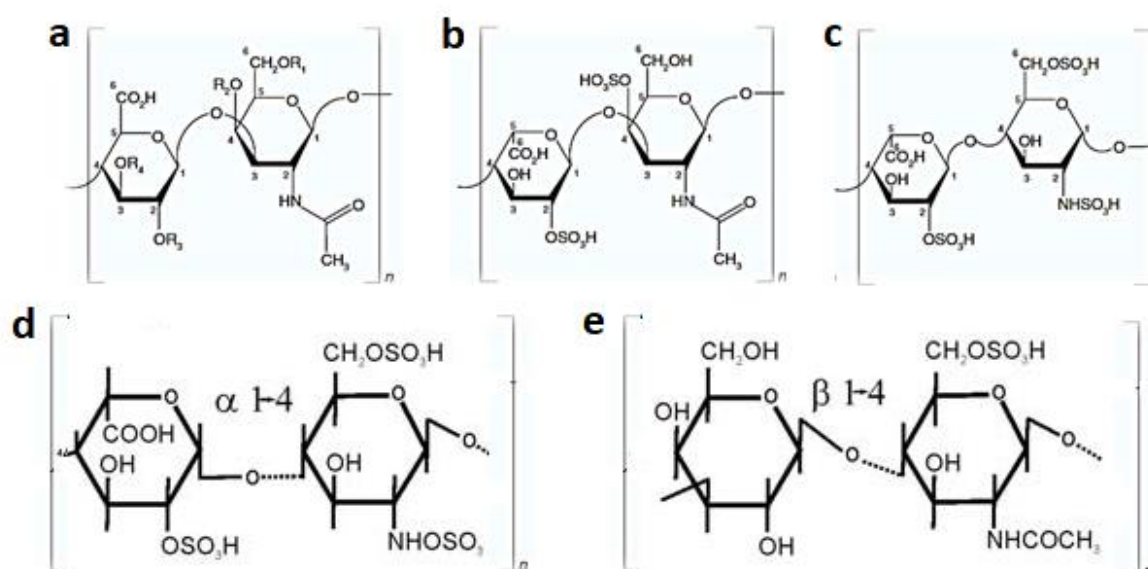
Os sulfatos presentes em uma GAG estão diretamente relacionados à sua ação anticoagulante, devido serem ânions fortes os quais interagem com os fatores de coagulação. E, no caso da heparina, estes grupos junto dos carboxilatos presentes, proporcionam a mais elevada carga negativa vista em uma molécula biológica conhecida (GUERRINI, 2008; TREHY, 2009; WIELGOS, 2009).

De acordo com HICHAM (2011) e BO (2013), o grau de sulfatação além de ser um fator crítico para o bom funcionamento ao promover ligações às várias proteínas; fornece informações sobre a qualidade da amostra e da presença de impurezas ou contaminantes. Portanto, um estudo do grau de sulfatação da GAG é necessário para o controle de qualidade.

A heparina e o sulfato de heparan são estruturalmente os membros mais complexos dos GAGs da família de polissacarídeos lineares, que inclui também o

sulfato de condroitina (SC), o dermatan sulfato (DS) e o keratan sulfato, mostrados na figura 4 (RABENSTEIN, 2002).

Figura 4 - Estruturas químicas dos principais glicosaminoglicanos: (a) sulfato de condroitina [R1 – R4 = não substituído ou sulfatado], (b) dermatan sulfato, (c) heparina, (d) sulfato de heparan e (e) keratan sulfato.



Fonte: (GUERRINI, 2008; PÉREZ, 2014).

A diversidade estrutural dos GAGs tornam-os complexos e distintos quanto a composição dos monossacarídeos, configuração, posição de suas ligações glicosídicas e interação com proteínas de ligação entre tipos de células, tecidos e espécies de animais. (SASISEKHARAN, RAMAN, PRABHAKAR, 2006; LIU, LINHARDT, ZHANG, 2014).

1.3 Estrutura do SC e DS

O SC é composto de ácido D-glicurônico ligado de forma β (1 → 3) à N-acetilgalactosamina (GalNAc), normalmente, sua estrutura possui um grupo sulfato nas posições 4 ou 6 na porção da N-acetilgalactosamina [GalNAc (4/6S)]. Enquanto que o DS tem em sua estrutura ácido L-idurônico ligado β (1 → 3) à galactosamina, com grupos sulfatos presentes no carbono 2 do ácido urônico e no carbono 4 da N-acetilgalactosamina [GalNAc (2S)]. Particularmente, o DS é o GAG mais difícil de

separar da heparina, por causa da similaridade estrutural (GUERRINI, 2008; WU, 2016).

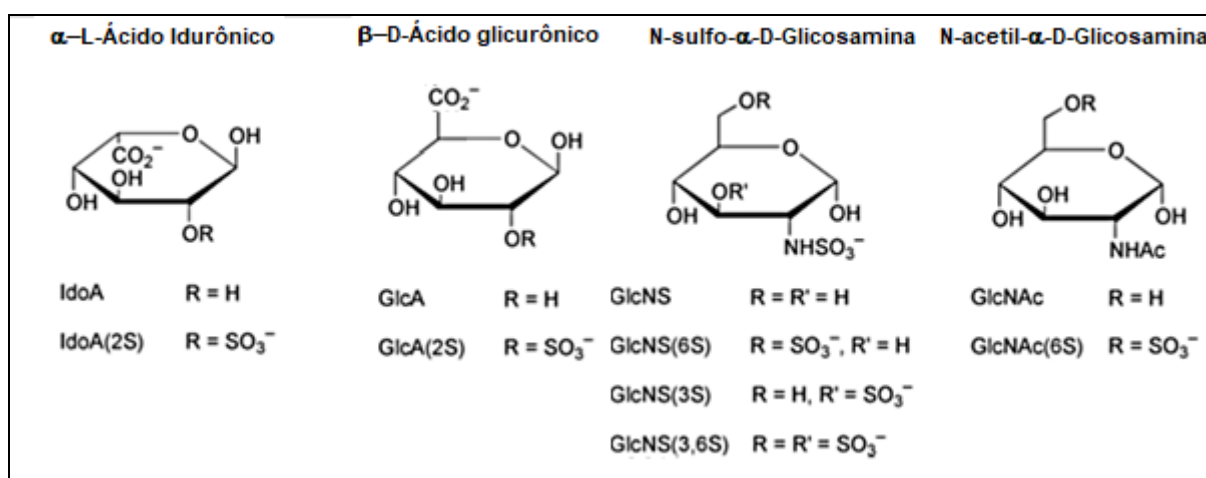
1.4 Estrutura da heparina

A Hep é constituída principalmente de ácido L-idurônico e N-sulfoglicosamina [GlcNS (6S)] ligadas de forma β (1 \rightarrow 4), altamente substituída com resíduos O-sulfato no carbono 6 dos resíduos de glicosamina e no carbono 2 dos resíduos de ácido urônico (ROSENFELD, PRIOR, GIRARDI, 1991).

RABENSTEIN (2002) propõe as variações dos monômeros de ácido urônico e glicosamina os quais promovem distintas combinações estruturais da heparina. As diversas modificações prováveis resultam em vinte e quatro dissacarídeos que podem ser formados a partir dos monômeros mostrados na Figura 5).

O monômero de ácido urônico pode ser encontrado como α -L-ácido idurônico (IdoA) ou β -D-ácido glicurônico (GlcA), com as seguintes substituições: 2-O-sulfatado [IdoA (2S) e GlcA(2S)]. Enquanto o monômero β -D-glicosamina (GlcN) pode ser N-sulfatado (GlcNS) ou N-acetilado (GlcNAc), ambos os quais podem ser de 6-O-sulfatado [GlcNS (6S) e GlcNAc (6S)], os GlcNS e GlcNS (6S) também podem apresentar-se como 3-sulfatado [S-GlcNS (3S) e GlcNS (3,6S)] (RABENSTEIN, 2002).

Figura 5 - Blocos de construção de monossacarídeos de heparina.



Fonte: (RABENSTEIN, 2002).

A heterogeneidade estrutural causada pelas estruturas e substituições variáveis junto com a distribuição das unidades de ácido urônico, não influenciam na atividade biológica ao comparar heparinas de mesma origem animal. Em contrapartida (NUGENT, 2000, apud VACCARI, 2003).

Em contrapartida, esta complexidade estrutural associada à alta carga negativa torna-se um grande desafio para atender aos padrões de qualidade atualmente exigidos em relação às características físico-químicas, de identidade, pureza e atividade biológica da heparina (PAN, 2010; JUNQUEIRA, 2011).

1.5 Heparina bovina e suína

Comercialmente, a extração de heparina ocorre da mucosa intestinal de suínos ou do tecido pulmonar bovino, porém não são fármacos equivalentes. A susceptibilidade em causar trombose e hemorragia, por exemplo, distingue entre ambas as espécies (AQUINO, LEE, PARK, 2010a; JUNQUEIRA, 2011).

Devido ser constituída de combinações de vários fragmentos com massas molares diferentes, as heparinas de origem bovina possuem massa molar de 12 kDa, enquanto que as de origem suína, cuja potência de ação é maior, estão na faixa de 15 kDa (CATANI, 2001; GOMES & BRAILE, 2009).

Curiosamente, RABENSTEIN (2002) afirma em seu estudo que dentre as diversas modificações esperadas, a sequência mais encontrada na heparina é a formada por IdoA (2S)-(1 → 4)-GlcNS (6S), em uma porção de até 90% em heparinas de pulmão bovino e de até 70% em mucosas suínas.

MULLOY, MOURÃO, GRAY (2000) ratifica que a heparina bovina possui em sua estrutura proporções mais elevadas de glicosaminas N-sulfatadas e menores proporções de resíduos N-acetilados, quando comparados com a heparina suína

Já o estudo de NOGUEIRA (2013) e SANTOS (2014) explica que as heparinas suínas, por mais que possuam menor grau de sulfatação, são mais ativas que as heparinas bovinas na inibição da α -trombina na presença de antitrombina III (AT), e isto pode explicar o porquê da matéria-prima extraída de porcos possuir potência de ação superior à extraída de bois, geralmente o dobro da atividade encontrada na heparina de origem bovina.

Fora os problemas relacionados com as diferenças estruturais, uma grande polêmica enfrentada, principalmente, pela heparina bovina é associação de seu uso com casos de trombocitopenia induzida por heparina (TIH) relacionada a eventos trombóticos com potencial risco de vida. Os efeitos colaterais ligados a TIH são pertinentes a possível falta de qualidade da matéria-prima e/ou a intolerância dos pacientes ao medicamento (DOS ANJOS, 2010).

BLOSSOM (2008) relaciona o produto bovino com casos de encefalite espongiforme bovina, mais conhecida como mal da vaca louca, abortando sua produção nos Estados Unidos e na Europa. No Brasil, ainda existem diversos produtores utilizando como matéria-prima a heparina de origem bovina.

Devido às alterações de potência de acordo com a origem da matéria-prima, o reajuste de dose e monitoramento mais apurado são essenciais quando há mudança do produto. Ficou acordado pela Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular (SBCCV) que, embora seguras para uso, as heparinas de origem bovina não são a escolha ideal para a cirurgia cardiovascular, ao contrário daquelas produzidas com intestino suíno (GOMES & BRAILE, 2009).

1.6 Heparina de baixa massa molar

Sabe-se que a Hep está associada a diversos efeitos colaterais, como a trombocitopenia induzida por heparina (TIH), principalmente relacionada com a heparina de origem bovina, cuja produção foi abortada nos Estados Unidos e na Europa devido aos casos de encefalite espongiforme bovina (mal da vaca louca). (BLOSSOM, 2008; DOS ANJOS, 2010).

Na década de 1980, surge no cenário científico as heparinas de baixa massa molar (HBMM) com o objetivo de produzir agentes anticoagulantes mais eficazes e seguros, minimizando os diversos efeitos colaterais apresentados pela heparina não fracionada (MINGHETTI, 2013).

A HBMM utiliza como matéria-prima a heparina não fracionada de origem suína, e isso a torna menos susceptível a interferência por aspectos de origem biológica, vistas com maior frequência na heparina bovina (HOPPENSTEADT, 2003).

O preparo das heparinas de baixa massa molar é fruto de controlada despolimerização química e/ou enzimática da Hep, possuindo massa molar reduzida, variando de 4 a 6 kDa. A extração envolve a hidrólise de uma mistura aquosa da mucosa do animal com enzimas proteolíticas sob aquecimento, seguida pela adsorção dos poliânions sulfatados por uma resina de troca iônica, sendo estes posteriormente recuperados. Durante o isolamento, as cadeias glicosaminoglicanas tornam-se levemente degradadas, produzindo mistura heterogênea de fragmentos com diferentes massas moleculares e propriedades biológicas (FILHO, 2009; MINGHETTI, 2013).

A heparina bruta é extraída por remoção dos demais glicosaminoglicanos considerados menos sulfatados, os chamados subprodutos. Como um resultado do seu elevado grau de sulfatação, a heparina tem maior atividade de anticoagulação quando comparada aos seus subprodutos menos sulfatados. Após os processos de extração e purificação, a heparina é então denominada não fracionada (PAN, 2010).

Em virtude deste complexo processo de extração e purificação existem controvérsias sobre a classificação do produto como semi-sintético ou biológico, a implementação de ensaios clínicos, e aos estudos farmacodinâmicos *in vivo*, dificultando desta maneira os estudos a respeito dos efeitos biológicos do produto em questão (MINGHETTI, 2013).

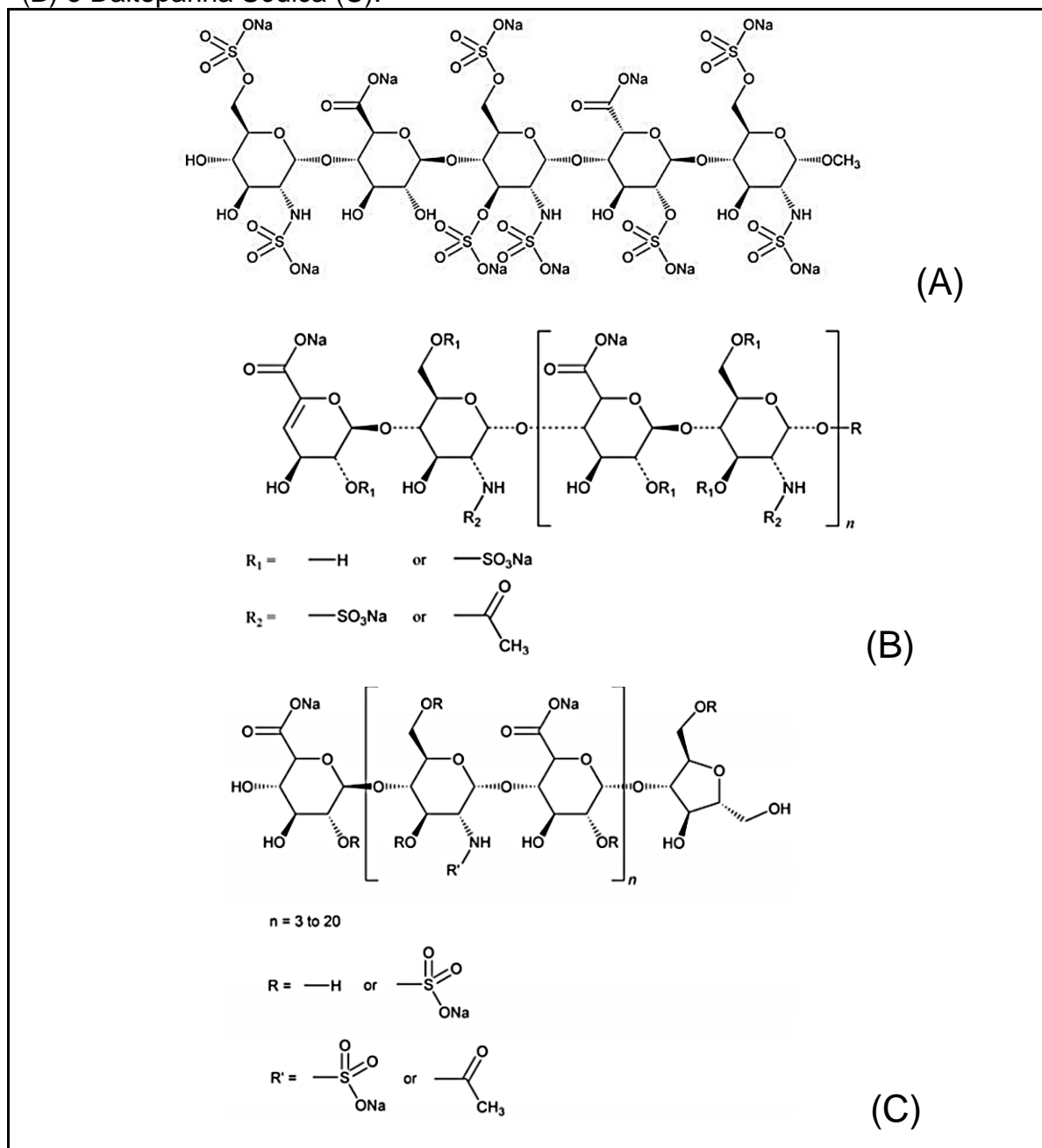
No entanto, a literatura contém diversas pesquisas, as quais são enfáticas sobre as reais vantagens da HBMM em detrimento à HEP: maior absorção subcutânea; menor propensão à hemorragia; propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas mais previsíveis; menor especificidade às ligações com proteínas do plasma e dos tecidos (aumentando sua biodisponibilidade); dispensa monitoramento laboratorial frequente; mais vantajosa para administração via subcutânea (COHEN, 2000; STAICO, 2004; VERLI, 2005; HIRSH, 2008).

Certas patentes de HBMM expiraram ou estão para expirar e com isso alguns produtos biológicos comparadores já estão disponíveis para uso clínico no Brasil, no entanto existem dúvidas sobre a real similaridade destes produtos em relação aos originais (MOURÃO, 2012).

Cada formulação comercial de HBMM apresenta propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas específicas e diferentes entre si (VERLI,

2005), isto ocorre devido ao processo de despolimerização submetido à Hep produzindo estruturas moleculares diversificadas, conforme visto nas três formulações distintas: Fondaparinux sódica (Figura 6A), enoxaparina sódica (Figura 6B) e dalteparina sódica (Figura 6C) (CHMIELEWSKI, STANLEY, STALCUP, 2011).

Figura 6 - Estruturas moleculares de Fondaparinux sódica (A); Enoxaparina Sódica (B) e Dalteparina Sódica (C).



Fonte: (THE UNITED, 2016e,d,c).

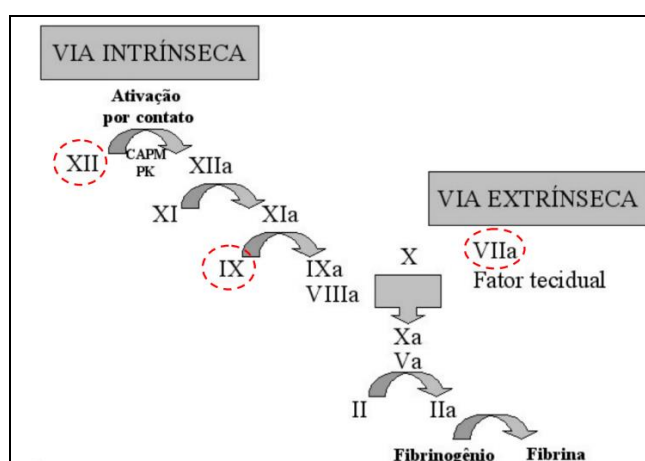
1.7 Modelo de cascata de coagulação baseado em superfícies celulares

Os vasos sanguíneos, ao sofrer uma lesão, passam por uma complexa sequência de fenômenos biológicos, os quais são definidos pelo nome hemostasia. Os mecanismos envolvidos no processo da hemostasia precisam ser regulados para evitar os extremos: extravasamento de sangue e formação de trombos intravasculares. Desta forma, este processo assegura a integridade vascular e tissular (SANTOS, 2015).

O mecanismo da coagulação do sangue inicia-se pela ativação do endotélio e finaliza-se na superfície de plaquetas ativadas, a partir de reações sequenciais de ativação e conversão de proteínas específicas. O produto final do processo é um polímero insolúvel chamado de fibrina, o qual forma uma rede de fibras elásticas que consolida o tampão plaquetário e o transforma em tampão hemostático. Estas reações enzimáticas são didaticamente agrupadas na forma de cascata (SANTOS, 2015).

A hipótese de cascata de coagulação proposto por Macfarlane, Davie e Ratnoff, em 1964, tinha como objetivo explicar a fisiologia da coagulação do sangue, através de duas vias: extrínseca e intrínseca, conforme Figura 7, onde os principais pontos de ativação estão destacados em vermelho (SILVA & MELO, 2016).

Figura 7 - Esquema da cascata de coagulação clássica.



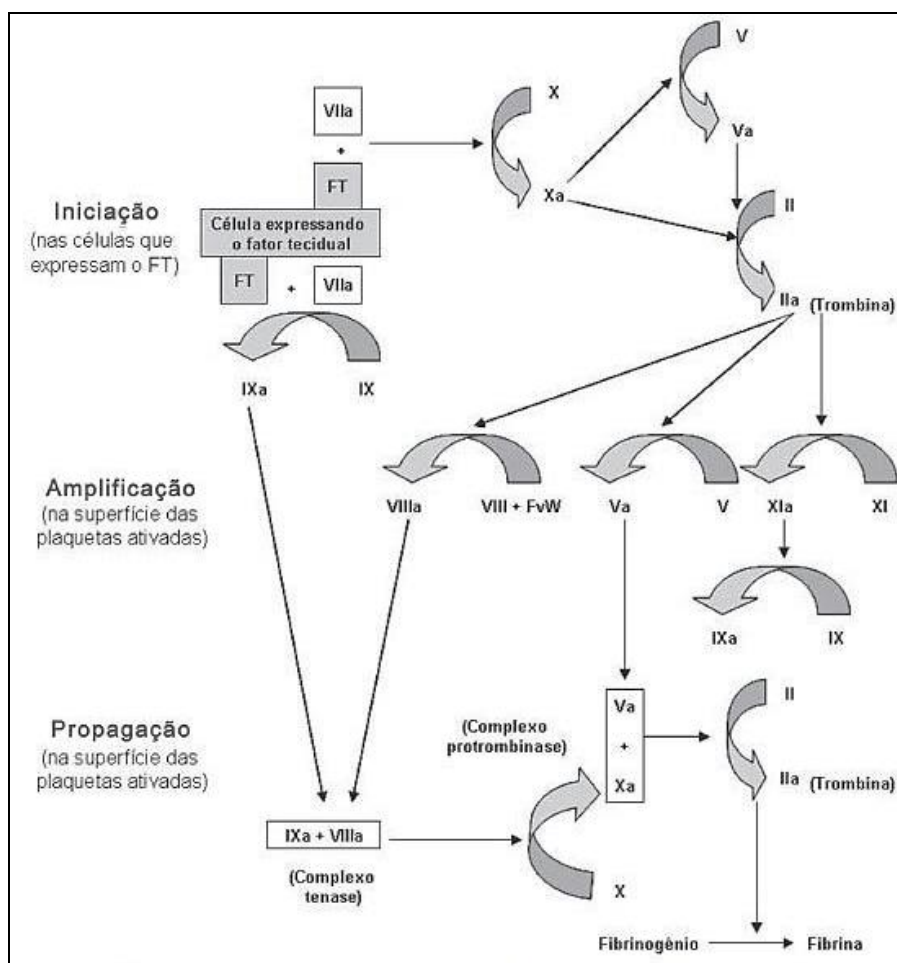
Fonte: (SILVA & MELO, 2016).

Por muito tempo este conceito foi aceito pela área acadêmica, embora observações experimentais e clínicas recentes demonstrarem que esta hipótese não reflita completamente os eventos da hemostasia *in vivo*, sendo pouco provável que as vias intrínseca e extrínseca operem de modo independente (SILVA & MELO, 2016).

Segundo certos estudos, o modelo da coagulação baseado em superfícies celulares substitui a cascata de coagulação clássica, ao sugerir que a ativação do processo de coagulação ocorre sobre diferentes superfícies celulares, ao invés de ser uma sequência de reações proteolíticas em cascata com a participação somente de componentes proteicos (FERREIRA, 2010; SILVA & MELO, 2016).

O processo então é dependente de células que expressam em sua superfície uma proteína transmembrânica que age como receptor e cofator para o fator VII, denominado fator tecidual (FT). E pode ser dividido em quatro fases: Fase de iniciação; Fase de amplificação; Fase de propagação e Fase de finalização, de acordo com FERREIRA (2010), evidenciados na Figura 8.

Figura 8 - Modelo de cascata de coagulação com base nas superfícies celulares.



Fonte: (FERREIRA, 2010).

O início da cascata de coagulação acontece quando há exposição de FT na corrente sanguínea, isto ocorre por lesão endotelial. A FT em contato com os componentes do sangue, rapidamente inicia o processo de coagulação, formando complexo FVIIa/FT que, por sua vez, ativa pequenas quantidades de FIX e FX. FXa ativa FV, e forma pequenas quantidades do complexo protrombinase, encerrando a etapa de iniciação (FERREIRA, 2010).

Na etapa de amplificação, a protrombinase transforma pequena parcela de protrombina (Fator II) em trombina (FIIa) e conseqüentemente são ativados os cofatores FV, FXI e FVIII na superfície das plaquetas. FVIIIa é alcançado em virtude da dissociação do complexo FVIII/FvW (FERREIRA, 2010).

A fase de propagação é caracterizada pela ativação das plaquetas após o contato com as proteínas da matriz subendotelial, em resposta à lesão vascular. As

proteínas ativadas causam uma exposição de fosfolipídeos aniônicos de superfície celular, responsáveis pela formação do complexo tenase nessa superfície. Este complexo é formado pelo FIXa ativado na fase de iniciação ligado ao FVIIIa que por conseguinte ativa FX. FXa e FVa formam o complexo protrombinase, resultando na conversão de grande quantidade de protrombina (FII) em trombina (FIIa) (CHAPIN & HAJJAR, 2015).

A trombina (FIIa) cliva fibrinogênio, solúvel em água, em monômeros de fibrina, insolúveis em água. Por último, na etapa de finalização é visto uma série de cofatores, inibidores e receptores capazes de limitar o processo de coagulação para evitar oclusão trombótica ao redor das áreas íntegras dos vasos (CHAPIN & HAJJAR, 2015).

1.8 Atuação fisiológica da heparina

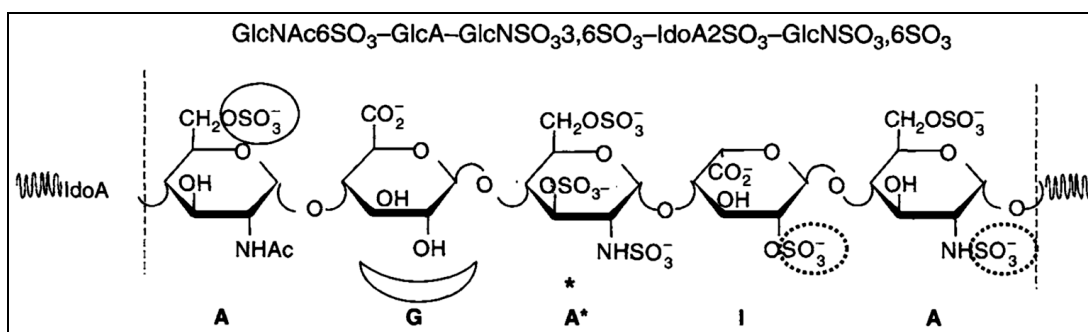
A antitrombina III (ATIII), encontrada na etapa de finalização da cascata de coagulação, é uma proteína responsável pela inibição da trombina e dos fatores IXa, Xa e XI, promovendo o equilíbrio hemostático (PROST, 1986; FERREIRA, 2010).

A heparina possui afinidade com a ATIII, potencializando sua função. Por isso, a atuação deste produto biológico sob a fase final da cascata de coagulação não é direta, uma vez que a heparina amplifica a ação, que normalmente é lenta, do inibidor natural, a ATIII (PROST, 1986).

Esta afinidade entre a heparina e a proteína acontece em virtude de uma sequência de pentassacarídeos encontrada na heparina, cuja interação determina uma mudança conformacional que resulta na ativação da ATIII, através do aumento da flexibilidade de seu sítio ativo (CHUANG, 2001).

A Figura 9 representa a sequência de pentassacarídeos distribuídos de forma aleatória na cadeia da heparina não fracionada. O monômero marcado com um asterisco (*) indica o resíduo de glicosamina supersulfatada característico desta unidade, enquanto que o grupo sulfato essencial para a interação à ATIII e os grupos sulfatos ligeiramente essenciais para a interação à ATIII, estão marcados com círculos fechados e pontilhados, respectivamente. O monômero indicado pela meia lua é essencial para a interação à ATIII (CASU, 2005).

Figura 9 - Sequência de pentassacarídeos que promovem ligação específica à ATIII.

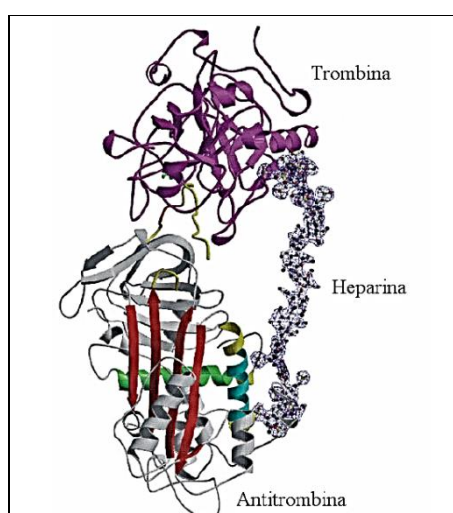


Fonte: (CASU, 2005).

Uma vez ativada pela heparina, a ATIII tem sua afinidade aumentada pelo fator Xa para mais de mil vezes. Este complexo formado por pentassacarídeos e ATIII é responsável pelo efeito anticoagulante, via inibição do fator Xa (STAICO, 2004).

As heparinas com no mínimo dezoito unidades de monossacarídeos são capazes também de inibir diretamente a trombina, por meio da ATIII, aumentando em até duas mil vezes esta inativação, promovendo a formação do complexo terciário composto por ATIII, longa cadeia de sacarídeos e trombina, conforme mostrado na Figura 10 (STAICO, 2004).

Figura 10 - Representação cristalográfica do complexo entre ATIII, trombina e heparina.

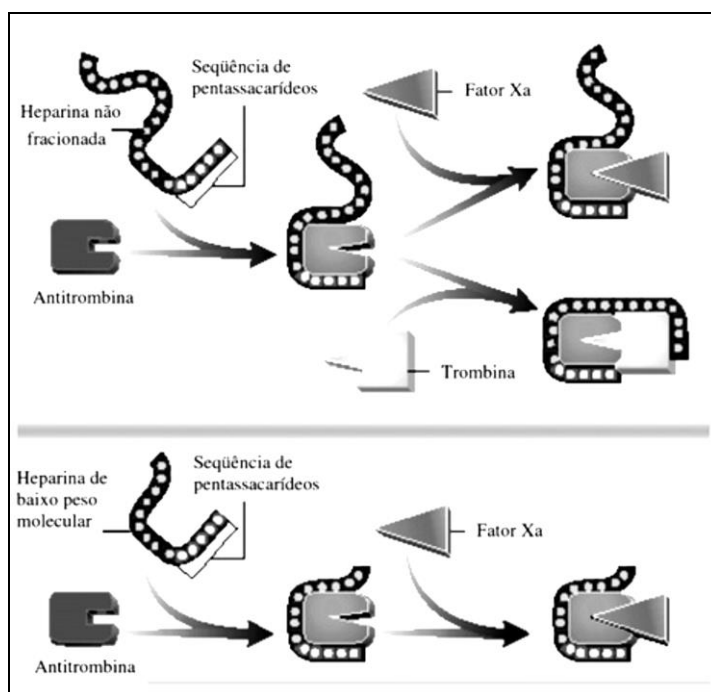


Fonte: (LI, 2004).

Tanto a inibição do fator Xa, quanto a inibição direta da trombina impede a conversão do fibrinogênio em fibrina. No entanto, apenas a Hep atua por meio destes dois mecanismos anticoagulantes. Enquanto que a inativação direta da trombina não é efetivada pela HBMM uma vez que as cadeias de sacarídeos não são suficientemente longas. Portanto a atividade contra o fator Xa é maior na HBMM do que na Hep (OFOSU & GRAY, 1988; STAICO, 2004).

A Figura 11 demonstra as principais diferenças entre a HBMM e a Hep em relação a sua atividade fisiológica.

Figura 11 - Mecanismo de ação da Heparina não fracionada e da Heparina de baixa massa molar.



Fonte: (STAICO, 2004).

Além disso, a heparina não fracionada intervém sob o complexo mecanismo da coagulação, os vasos sanguíneos, e os efeitos antiplaquetários. Em virtude desta dose-resposta acentuada, o uso prolongado eventualmente, causa trombocitopenia, diminuindo o nível de plaquetas livres no sangue. (STAICO, 2004; MENAJOVSKY, 2005).

A imprevisibilidade do efeito anticoagulante pela via endovenosa é decorrente da interação não específica entre a Hep e as proteínas circulantes, a ATIII compete

com as proteínas plasmáticas na ligação com a Hep. Um dos efeitos adversos que a heparina em altas concentrações no organismo pode ocasionar é a hemorragia (PATEL, BERRY, CHAN, 2007).

1.9 Crise clínica e farmacêutica causada pela heparina

A qualidade da heparina disponível no mercado mundial foi colocada em questionamento com os acontecimentos ao final de 2007 e início de 2008, onde foi reportado pela Food and Drug Administration (FDA) cerca de 350 casos de efeitos adversos devido ao uso de heparina nos Estados Unidos (FILHO, 2009).

KISHIMOTO (2008) narra a crise clínica e farmacêutica referente ao uso de heparina sódica, quando as autoridades de saúde nos Estados Unidos foram alertadas para um aumento de efeitos como angioedema, hipotensão, inchaço da laringe e mortes; associados aos tratamentos que empregavam lotes de heparina suína fabricados pela empresa Baxter Healthcare Corporation.

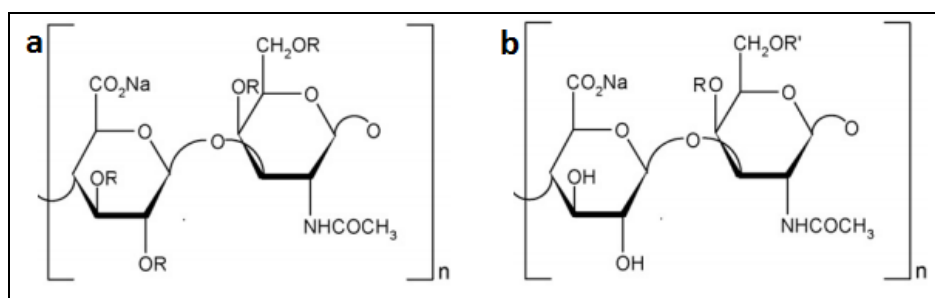
As normas brasileiras na época previam que o controle das preparações de heparina não fracionada fosse baseado, exclusivamente, no teste do tempo de coagulação do plasma. Entretanto este método entrou em desuso por não atender aos requisitos propostos nos compêndios oficiais, reportando a preocupação com o produto ofertado (MELO, 2008).

A investigação dessas amostras suspeitas apontou teor de 20% de condroetina supersulfatada (OSCS) e maiores de 1% em peso de dermatan sulfato (DS). Autores apontam que a exposição a determinados vírus suínos desencadeiam a produção de pequenas quantidades de OSCS, mas nada comparado a grande quantidade encontrada nestes lotes (KEMSLEY, 2008; KEIRE, 2010).

Através da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) foi elucidada a estrutura da condroetina supersulfatada, composta por repetidas unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico e galactosamina, ligados da forma β (1 \rightarrow 3), análoga ao sulfato de condroetina, porém com um padrão peculiar de sulfatação encontrado nas posições 2 e 3 do ácido glicurônico e em 4 e 6 da galactosamina [GalNAc (2,3,4,6S)] (GUERRINI, 2008).

A figura 12 mostra as estruturas da condroetina supersulfatada (OSCS) e do sulfato de condroetina que se apresenta como duas espécies A e C. Os grupamentos denominados R e R' são radicais possivelmente sulfatados, a OSCS é totalmente sulfatada enquanto que a maior parte do sulfato de condroetina A tem grupamento sulfato no carbono 4 (R) e o sulfato de condroetina C na posição do carbono 6 (R') ambos na porção da GA (BEYER, 2010).

Figura 12 - Fórmula estrutural de OSCS (a) e sulfato de condroetina (b).



Fonte: (BEYER, 2010).

O SC não possui potencial atividade anticoagulante se comparado à OSCS - produto não-natural obtido através de modificações químicas do SC com ação biológica similar a realizada pela heparina. A OSCS é economicamente mais rentável em relação à heparina, sendo assim, um grande viés para adulteração (GUERRINI, 2008).

Os efeitos colaterais atribuídos a OSCS podem ser explicados pela alta carga negativa desta molécula rica em grupamentos sulfatos, com potencial alto para ativação do Fator XII no plasma, e desta forma, desencadeando uma série de complicações ao organismo (SCHWARTCZ, 2008; KISHIMOTO, 2008).

O dermatan sulfato, considerado impureza, quando encontrado em grandes quantidades nas formulações de Hep é decorrente dos processos de purificação incompleta e ainda, pode indicar má qualidade da matéria-prima empregada (TREHY, 2009).

Entretanto, devido a heparina ser um produto biológico, ela está susceptível a conter níveis inferiores a 1% de várias impurezas naturais, tais como os demais GAGs que não estão associados a efeitos adversos à saúde do paciente, porém não

apresentam significativa atividade anticoagulante devido ao baixo grau de sulfatação (KEIRE, 2010; PAN, 2010).

1.10 A heparina e a vigilância sanitária

De acordo com a Lei n.º 8.080/90, Vigilância Sanitária é 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, cuja função é assegurar que esses produtos não ofereçam risco algum à saúde pública mediante o monitoramento da qualidade de seus lotes (BRASIL, 1990).

O monitoramento dos produtos no mercado é um dos instrumentos valiosos para a efetividade das ações de vigilância sanitária. E para tanto análises laboratoriais são necessárias a fim de que se verifique a conformidade dos produtos com as normas sanitárias. Para identificar riscos iminentes ou virtuais de agravos e assegurar a garantia da qualidade de produtos, serviços e ambientes (COSTA, 2001).

O último relatório emitido pela Câmara de Medicamentos (CMED) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016) evidencia um grande número de formulações com heparina como princípio ativo (PA). Existem dois tipos de apresentação de heparina sódica suína: injetável e de uso tópico, dois laboratórios produzem a primeira apresentação e três, a segunda apresentação. Em contrapartida, são encontradas quatro HBMM na forma injetável: enoxaparina sódica, com sete produtores diferentes; dalteparina sódica, bemiparina sódica e nadroparina cálcica, com apenas um laboratório produzindo cada uma.

Conforme a definição da Resolução da Comissão Intergestores Tripartite (CIT) nº 01, de 17 de janeiro de 2012, a heparina sódica suína de 5000UI/0,25 mL está contida na Relação Nacional de Medicamentos do Componente Básico da Assistência Farmacêutica (CBAF), onde se encontram medicamentos e insumos farmacêuticos, voltados aos agravos prevalentes e prioritários da Atenção Básica e programas de saúde específicos (RENAME, 2015).

MELO (2008) demonstra em seus estudos a precariedade do controle de qualidade das formulações de heparina comercializada no Brasil, onde a maior parte carece de análises detalhadas quanto à pureza, à integridade estrutural e à potência anticoagulante.

Diante da frequente não conformidade dos produtos de heparina, ora por apresentar contaminantes e impurezas, ora por não atingir o efeito esperado ou provocar efeitos colaterais é imprescindível procurar métodos eficazes para análise dos produtos disponíveis no mercado brasileiro.

1.11 Estado da arte de heparina

Um dos maiores desafios analíticos encontrados para a avaliação das preparações de heparina ocorre devido à elevada carga negativa, polidispersidade e complexidade estrutural desta espécie. Isto pode explicar a dificuldade em escolher uma técnica eficiente para a detecção de subprodutos indesejáveis, bem como, estabelecer protocolos de preparação da amostra (RABENSTEIN, 2002).

Métodos que quantifiquem os níveis de sulfatação podem ser utilizados para avaliar a pureza de amostras de heparina (GUERRINI, 2008), pois a natureza altamente sulfatada desse composto permitiu invalidar os ensaios tradicionais, como o tempo de coagulação (KISHIMOTO, 2008).

Inicialmente a eletroforese capilar (EC) mostrou-se eficiente para uma separação bruta do composto similar a heparina até então desconhecido. Este método, em conjunto com a RMN tornaram-se bem sucedidos para o controle de qualidade da heparina, sendo possível, a partir dos resultados obtidos, promover a redução de casos de contaminação e incidências de reações adversas em âmbito mundial (WIELGOS, 2009).

Após a crise clínicas os compêndios oficiais necessitaram implementar métodos mais eficientes e que pudessem atestar mais fielmente a qualidade do produto oferecido a população. Neste contexto, a Farmacopeia brasileira contém monografias para Hep cálcica (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010b) e sódica (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010c), cujo princípio ativo e finalidade são os

mesmos, mas as duas são destinadas para matéria-prima e não para o produto acabado.

Quanto às análises preconizadas para matéria-prima encontram-se: Identificação com a técnica de RMN H^1 e de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de troca iônica e detecção espectrofotométrica a 202 nm; Ensaios de pureza, como: pH, proteínas, metais pesados, nitrogênio, cálcio/sódio por espectrofotometria de absorção atômica, perda por dessecação, cinzas sulfatadas e impurezas nucleotídicas; Teste de segurança biológica com análise de endotoxinas bacterianas e Doseamento feito pela determinação de potência, potência anti-fator IIa e atividade anti-fator Xa (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010b,c).

Observa-se que as monografias de matéria-prima de Hep pertencentes à FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010 b,c) são semelhantes a Farmacopeia Europeia (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2015c,d) cujo conteúdo aborda também monografias referentes a HBMM, observa-se uma divisão entre heparina de baixa massa molar (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2015a), enoxaparina sódica (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2015b) e dalteparina sódica (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2015e).

Na monografia geral de HBMM são preconizados testes de identificação a partir da técnica de RMN C^{13} , razão da atividade anti-fator Xa e anti-fator IIa, determinação da massa molar por cromatografia de exclusão molecular com detecção de índice de refração diferencial, além de análise de cálcio/sódio por espectroscopia de absorção atômica; E testes adicionais, como: pH, nitrogênio, razão molar entre íons sulfato e íons carboxilatos por CLAE de troca iônica e detecção de condutividade, metais pesados, perda por dessecação e endotoxinas bacterianas (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2015a).

No que se refere à enoxaparina sódica além dos testes gerais, existem alguns específicos para a HBMM em questão, como: Método de digestão da HBMM com heparinase I, II e III com análise por cromatografia de troca iônica e detecção espectrofotométrica a 234 nm, com posterior associação entre retenção relativa dos sinais cromatográficos e dados de massa molar contidos na farmacopeia; Absorbância específica por espectroscopia; Análise de álcool benzílico por CLAE de fase reversa e detecção espectrofotométrica a 256 nm; e Aparência da solução. Já

para a dalteparina sódica, é visto a análise de nitrito por CLAE de troca iônica e detecção eletroquímica, de boro por espectroscopia de absorção atômica e perda por dessecação (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2015b,e).

A Farmacopeia Americana é mais abrangente a respeito de monografias para heparinas, seja em formas farmacêuticas distintas: Matéria-prima (THE UNITED, 2016g) e injetável (THE UNITED, 2016h); seja quanto as HBMMs, por conter monografias para enoxaparina sódica (THE UNITED, 2016d), dalteparina sódica (THE UNITED, 2016c) e fondaparinux sódica (THE UNITED, 2016e).

Para a matéria-prima é preconizada a identificação por ^1H RMN, a CLAE de troca iônica e detecção espectrofotométrica a 260 nm; a razão entre a atividade anti-fator Xa e anti-fator IIa; a determinação da massa molar por CLAE de exclusão molecular e detector de índice de refração; e teste de chama para sódio. Adicionalmente, os testes já citados em outros compêndios, como: nitrogênio, resíduos de metais pesados, impurezas nucleotídicas por CLAE de fase reversa e detecção espectrofotométrica a 260 nm, endotoxina bacteriana e perda por dessecação. Salvo três exceções: teste de esterilidade; impureza proteica analisada por teste de Lowry; E análise de limite de galactosamina em hexosaminas totais a partir da CLAE de troca iônica com detecção amperométrica pulsada (THE UNITED, 2016g).

A forma farmacêutica de Hep injetável, vista apenas na Farmacopeia Americana, deve ser submetida a ensaio de potência anti-fator IIa, endotoxina bacteriana, material particulado e pH, somente (THE UNITED, 2016h)

Os testes preconizados para a enoxaparina sódica, uma HBMM, são: Absorção no ultravioleta (UV) por espectroscopia; RMN C^{13} ; razão entre a atividade anti-fator Xa e anti-fator IIa; distribuição de peso molecular e peso molecular médio por CLAE de exclusão molecular e detecção de índice de refração diferencial ; análise de álcool benzílico por CLAE de fase reversa e detecção espectrofotométrica a 256 nm; determinação de sódio por absorção atômica; determinação de nitrogênio, metais pesados, pH, perda por dessecação, endotoxina bacteriana, atividade anti-fator IIa, razão molar entre sulfato e carboxilato por CLAE de troca iônica e detector de condutividade (THE UNITED, 2016d).

A dalteparina sódica, segundo a Farmacopeia Americana, necessita ser analisada por ^1H RMN, distribuição de peso molecular e peso molecular médio, razão entre a atividade anti-fator Xa e anti-fator IIa, determinação de nitrogênio, sódio, limite de nitritos por CLAE de troca iônica e detecção eletroquímica, determinação de Boro por espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP), atividade anti-fator IIa, razão molar entre sulfato e carboxilato por CLAE de troca iônica e detector de condutividade, pH, perda por dessecação e teste de endotoxinas bacterianas (THE UNITED, 2016c).

A monografia da fondaparinux sódica recomenda a análise de identificação por RMN H^1 e CLAE de troca iônica e detecção espectrofotométrica a 210 nm, mais a determinação de sódio por espectroscopia de absorção atômica; determinação de sulfatos livres e cloreto residual por CLAE de troca iônica e detecção de condutividade; impurezas orgânicas por CLAE de troca iônica e detecção no UV a 210 nm; determinação de piridina e etanol por cromatografia gasosa e detecção por ionização de chama; teste de endotoxina bacteriana, pH, enumeração microbiana e determinação de água (THE UNITED, 2016e).

Diversas técnicas para avaliação físico-química de heparina não fracionada e de baixa massa molar são encontradas na literatura. Entre elas, a RMN H^1 e a CLAE por troca iônica são as mais encontradas (PATEL, NARKOWICZ, JACOBSON, 2009; WIELGOS, 2009; GALEOTTI & VOLPI, 2011).

Entretanto, a RMN é uma instrumentação dispendiosa enquanto que a CLAE é uma técnica convencional e mais versátil para a análise dos componentes da heparina (CHMIELEWSKI, STANLEY, STALCUP, 2011; ZANG, 2011).

1.12 A análise físico-química de heparina sódica suína a partir de cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica

A CLAE utiliza instrumentos automatizados, com colunas recheadas de materiais preparados para eluir a fase móvel sob altas pressões com ou sem aquecimento, conferindo, assim, a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de substâncias não voláteis e termolábeis,

relativamente em pouco tempo, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS, BRAGA, BONATO 1987).

O equipamento é composto da bomba que impulsiona a fase móvel pelo sistema cromatográfico; O injetor, responsável pela injeção da amostra no sistema; A presença facultativa de uma pré-coluna; A coluna cromatográfica que contém a fase estacionária; Detector; E dispositivo de captura (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010a).

A técnica consiste na distribuição dos componentes da amostra sob alta pressão entre duas fases: estacionária e móvel. A fase estacionária fixa na coluna pode ser composta de um sólido ou líquido fixo em uma superfície sólida ou gel, enquanto que a fase móvel pode ser líquida, gás ou fluido supercrítico (VALE, 2012).

A fase móvel líquida junto com os componentes da amostra são forçados através da fase estacionária sólida e imiscível, os analitos mais fortemente retidos na fase estacionária movem-se muito lentamente no fluxo da fase móvel, enquanto que os demais com ligação mais fraca movem-se mais rapidamente (SKOOG, 2006).

Essa diferença na mobilidade dos componentes promove a separação em bandas ou zonas discretas que, após detecção adequada, podem ser analisadas qualitativa e/ou quantitativamente através de detectores localizados logo após ao final da coluna cromatográfica e ligados a registradores. Existem diversos tipos de detectores, como por exemplo: ultravioleta (UV); amperométrico; entre outros; (JUNIOR, 2004).

Frequentemente uma coluna de proteção pode ser colocada antes da coluna analítica para aumentar sua vida útil, ela é mais curta e remove material particulado ou contaminante dos solventes, além de saturar a fase móvel com a fase estacionária para minimizar a perda desta na coluna analítica. Esta pré-coluna deve possuir composição semelhante a fase estacionária da coluna analítica podendo variar apenas o tamanho da partícula que por ser maior, minimiza a queda da pressão (SKOOG, 2006).

O fenômeno de separação é alcançado por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou por interações estereoquímicas; dependendo da fase estacionária utilizada. Na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária é

composta de resinas de estireno e divinilbenzeno altamente carregadas, cujos grupos funcionais são capazes de adsorver cátions e ânions de um analito, caso sejam trocadoras catiônicas ou aniônicas, respectivamente (NETO, 2003).

No caso de trocadores aniônicos, as resinas são funcionalizadas com amônia quaternária a qual adsorve solutos de carga negativa da fase móvel, como sulfato, cloreto, nitrato, entre outros. Os solutos adsorvidos pela fase estacionária são eluídos por deslocamento com outros íons, de mesma carga, no entanto com maior força de interação com o grupo funcionalizado (COLLINS, BRAGA, BONATO 1987).

Os detectores mais frequentemente usados em CLAE são os espectrofotométricos, específicos para grupamentos cromóforos presentes no analito. Esses detectores consistem de uma célula de fluxo localizada no término da coluna cromatográfica, por onde a radiação UV atravessa constantemente, sendo recebida no detector. As substâncias são eluídas da coluna, passam pela célula de detector e absorvem a radiação, resultando em alterações mensuráveis no nível de energia (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010a).

A detecção pode acontecer em um comprimento de onda fixo, variável ou múltiplo. Os detectores de comprimento de onda múltiplo medem simultaneamente, a absorbância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados de detectores de arranjo de fotodiodos (DAD). Nestes, a radiação UV é transmitida através da célula de fluxo, absorvida pela amostra e então separada em seus componentes originais, que são detectados individualmente, pelo detector de DAD, registrando dados de absorbância em toda faixa do espectro do UV e visível (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010a).

Em contrapartida, a detecção eletroquímica oferece vantagens em relação à espectrofotométrica, quando as espécies de interesse não possuem um grupo cromóforo que absorve na região UV visível ou quando as espécies apresentam baixo coeficiente de absorbância molar (DOS SANTOS, 2009).

Na detecção eletroquímica acoplada à cromatografia líquida, apenas compostos com grupos eletroativos são detectados, a partir de aplicação de potencial sob a célula de detecção promovendo reações de oxi-redução entre esta e o analito. A célula de detecção geralmente é composta de eletrodo anódico sólido, como ouro e prata, um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar. Devido aos

carboidratos não possuem estabilização eletrônica inerente, os radicais livres formados com as reações de oxi-redução são adsorvidos na superfície do eletrodo de metal que têm orbitais d livres, ou seja, a superfície do eletrodo tem participação direta no mecanismo de oxidação, caracterizando-se por um processo electrocatalítico somente conseguido em meio alcalino (MEJÍA, 2013).

Tanto a detecção de arranjo de fotodiodos, quanto à detecção amperométrica pulsada acoplada ao cromatógrafo líquido de alta eficiência com coluna de troca iônica são métodos preconizados na Farmacopeia americana (THE UNITED, 2012; THE UNITED, 2016g) para análise físico-química de heparina como matéria-prima.

Um dos métodos abordados com CLAE por troca iônica se refere à identificação do(s) analito(s) contido(s) nas formulações de heparina sódica, principalmente para detecção e separação de DS e OSCS. Para este ensaio é utilizado cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna de troca iônica e detecção DAD, a qual mede diversos comprimentos de onda simultaneamente na faixa do UV.

O fenômeno ocorrido neste tipo de cromatografia por troca iônica é explicado pela interação da resina de sal quaternário de amônio em uma cadeia alifática de álcool constituinte da fase estacionária da coluna *Ion Pac AS11*, com os ânions provenientes dos grupos sulfatos presentes nas moléculas de glicosaminoglicanos, devido a esta afinidade, espécies com maior quantidade de grupos sulfatos demoram mais a eluir do que as com menores substituições de sulfato (DIONEX, 2015).

O segundo método consiste na utilização da técnica CLAE com coluna de troca iônica e detecção amperométrica pulsada. Este método é considerado ensaio limite, pois é realizado uma análise, com limite pré-estabelecido, de teor relativo de GAG_s que possuam galactosamina em sua estrutura, como DS e OSCS a partir da Glicosamina presente advindo da heparina nas formulações.

A coluna cromatográfica utilizada é denominada *CarboPac PA20*, constituída de resina trocadora de ânions de sal de amônio quaternário e indicada para separações com alta de resolução de mono e dissacarídeos. Após a hidrólise submetida ao padrão e a amostra, a galactosamina e a glicosamina presentes interagirão com a coluna cromatográfica (DIONEX, 2016).

A detecção então é realizada pelas reações de oxi-redução ocorridas entre o analito e a célula do detector amperométrico pulsado a partir de diferença de potencial empregado na análise conforme o método do compêndio (THE UNITED, 2016g).

1.12.1 Adequação do sistema cromatográfico por CLAE

A adequação do sistema é necessária para avaliar se o sistema cromatográfico está adequado para a análise pretendida. Existem fatores específicos a cada sistema/condições de análise que podem alterar o comportamento cromatográfico, como: composição, força iônica, temperatura e pH da fase móvel; taxa de fluxo, dimensões, temperatura e pressão da coluna cromatográfica; e características da fase estacionária: partícula, tamanho dos macroporos e área superficial específica (THE UNITED, 2016a).

Portanto, certos parâmetros de adequação são preconizados pela Farmacopeia Americana (THE UNITED, 2012; THE UNITED, 2016g), cujos resultados obtidos precisam encontrar-se dentro do critério de aceitabilidade, pois é requisito essencial para prosseguir o processo de validação analítica. O quadro 1 apresenta os parâmetros de adequação desejáveis a serem avaliados de acordo com cada método.

Quadro 1 - Critérios de aceitabilidade para os parâmetros de adequação da separação cromatográfica

Método para identificação de heparina, dermatan sulfato e condroitina supersulfatada em formulações de heparina sódica suína.		Método para a determinação do limite de galactosamina em hexosaminas totais presentes em formulações de heparina sódica suína.	
Parâmetros de Adequação	Critério de Aceitabilidade	Parâmetros de Adequação	Critério de Aceitabilidade
Resolução (Rs)	Superior a 1,0 entre DS e heparina; e 1,5 entre heparina e OSCS	Resolução (Rs)	Superior a 2,0 entre os sinais cromatográficos de galactosamina e glicosamina
Desvio padrão Relativo (DPR)	Inferior a 2% (n ≥ 3)	Nº. de pratos teóricos (N)	Superior a 2000 para sinal cromatográfico de glicosamina
		Fator de assimetria (Tf)	Superior a 0,8 e inferior a 2,0 para os sinais cromatográficos de galactosamina e glicosamina

Fonte: (THE UNITED, 2012; THE UNITED, 2016g).

1.12.1.1 Resolução (Rs)

Parâmetro definido como medida quantitativa da separação de dois picos sucessivos. Para o cálculo são necessários dois fatores: a distância entre seus tempos de retenção (Tr) e a largura da base (W), vistos na Equação (1) (LANÇAS, 2009).

$$R_s = \frac{2 (Tr)_A - (Tr)_B}{(W_A + W_B)} \quad (1)$$

1.12.1.2 Desvio padrão relativo

As replicatas de injeção de uma solução padrão devem ser comparadas para determinar se as exigências de precisão são cumpridas. Para tanto, pode ser utilizada a média dos resultados de tempos de retenção (Tr) e/ou Área do sinal cromatográfico, conforme Equação (2) (THE UNITED, 2016b).

$$\%DPR = \frac{100}{X} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - X)^2}{N-1}} \quad (2)$$

1.12.1.3 Eficiência ou número de pratos teóricos (N)

Medida da eficiência da coluna pode ser calculada pela equação (3), onde T_r seria o tempo de retenção e W , a largura do pico. O valor de N depende da substância a ser separada pela cromatografia, bem como, das condições operacionais, como as especificidades da coluna cromatográfica e a temperatura da fase móvel (THE UNITED, 2016a).

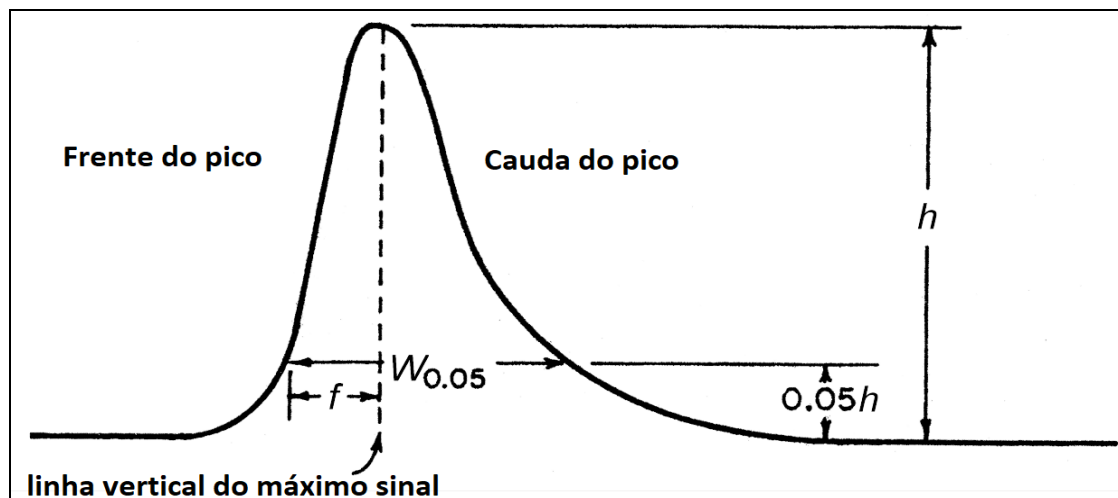
$$N = 16 \times \left(\frac{T_r}{W}\right)^2 \quad (3)$$

1.13.1.4 Fator de simetria do pico (A_s)

Uma medida da simetria de pico é necessária para evitar imprecisão e integração errônea. Quanto mais assimétrico, maior será o valor de A_s , calculado conforme a equação (4), onde $W_{0,05}$ é a largura do pico a 5% da altura e f seria a distância perpendicular entre a linha vertical do sinal máximo e a borda do sinal cromatográfico, esta distância é medida em um ponto 5% da altura do pico a partir da linha de base, conforme a figura 13 (THE UNITED, 2016a).

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (4)$$

Figura 13 - Demonstração dos parâmetros para determinação da simetria do pico.



Fonte: (THE UNITED, 2016a).

1.12.2 Validação do método analítico

A validação garante, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2017).

Segundo INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (2010), métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos e/ou ampliações e modificações de métodos normalizados necessitam de validação com o intuito de confirmar se o sistema e os métodos são apropriados para o uso pretendido. Desta forma, a validação pode ser justificada neste trabalho em virtude da análise do produto acabado a partir de método contida em compêndio oficial destinada à matéria-prima.

Esta exigência de validação de métodos analíticos é estabelecida por órgãos reguladores do Brasil e de outros países a fim de verificar a competência técnica dos laboratórios quanto aos resultados obtidos. No Brasil, duas agências são credenciadas para tal tarefa: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), ambas disponibilizam guias para o procedimento de validação (BRASIL, 2017; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2010).

A RDC 166/2017 é o compêndio mais atualizado aplicável a métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos desde a matéria-prima até o produto acabado (BRASIL, 2017).

Os parâmetros de validação e seus respectivos critérios de aceitação devem ser definidos de acordo com as características do analito e da natureza do método. Sendo assim, a quadro 2 demonstra os parâmetros usados para cada método cromatográfico baseado no documento mais utilizado.

Quadro 2 - Parâmetros de validação para cada método cromatográfico avaliada.

Parâmetros	Método para identificação de heparina, dermatan sulfato e condroitina supersulfatada em formulações de heparina sódica suína .	Método para a determinação do limite de galactosamina em hexosaminas totais presentes em formulações de heparina sódica suína .
Precisão	Não	Não
Seletividade	Sim	Sim
Exatidão/ Recuperação	Não	Não
Robustez	Não	Não
Linearidade/ Sensibilidade	Não	Não
Faixa de trabalho/ Intervalo	Não	Não
Limite de detecção	Não	Sim
Limite de quantificação	Não	Não

Fonte: (BRASIL, 2017).

1.12.2.1 Seletividade

O parâmetro seletividade analisada em um método analítico deve ser provada por meio da sua capacidade de identificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra (BRASIL, 2017).

Nos casos de métodos de identificação, a seletividade deve ser atestada pela sua capacidade de obter resultado positivo para amostra contendo o analito e resultado negativo para outras substâncias presentes na amostra. Preconiza-se utilizar substâncias estruturalmente semelhantes ao analito (BRASIL, 2017).

Já em ensaios limite este parâmetro deve ser demonstrado por meio da comprovação de que a resposta analítica se deve exclusivamente ao analito, sem interferência de diluente, de impurezas, ou de produtos de degradação (BRASIL, 2017).

1.12.2.7 Limite de detecção (LD)

O LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2010).

Isso é justificado quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis de quaisquer analitos, neste método onde contaminante e impureza são investigados é necessário saber qual a menor concentração que pode ser detectada pelo método de maneira que seja distinguido do sinal do branco/ruído.

O estabelecimento do LD é realizado por meio de análise de soluções contendo o analito com concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável. De forma a comprovar o valor encontrado experimentalmente pelo método visual, é utilizado o método relação sinal-ruído definido pela proporção 3:1 ou 2:1 entre o sinal do analito e o sinal-ruído (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005).

1.13 A técnica de ressonância magnética nuclear H^1 e sua contribuição para comprovação da eficiência do método cromatográfico de identificação

A técnica de ressonância magnética nuclear é conhecida pela sua importância na elucidação estrutural de uma molécula e permite a detecção de muitos núcleos, como por exemplo, o próton H^1 (BRANCO, 2015).

Uma das abordagens mais atuais da técnica é a espectrometria pulsada que consiste em submeter uma amostra a um campo magnético para ser irradiada com um pulso de energia de radiofrequência de alta potência, o qual atinge uma faixa de frequência suficiente para cobrir a região de interesse, excitando os núcleos dos hidrogênios da amostra (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2013).

Os núcleos excitados ao retornarem ao nível fundamental transmitem energia, a qual é coletada por um detector com aquisição do sinal de RMN no domínio do tempo. A informação em função do tempo é, então, convertida pela transformação de Fourier (TF) em um espectro convencional, em função da frequência (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2013).

Moléculas cuja composição possua átomos eletronegativos tendem a perder com mais facilidade seus hidrogênios subsequentes, devido à desestabilização da nuvem eletrônica obtendo distintos sinais de deslocamento químicos de seus núcleos de hidrogênio em frequências diversas retratadas no espectro (SANTOS & CONALGO, 2013).

Quanto maior a frequência onde se encontra um sinal, menor é a blindagem em torno do(s) hidrogênio(s) mais de uma linha espectral, de acordo com a natureza da molécula (SANTOS & CONALGO, 2013).

A RMN H^1 é amplamente usado para analisar as estruturas de heparina e possíveis impurezas e contaminantes, desde a época da crise de saúde pública enfrentada pelo fármaco em 2008. Os métodos contidos na FARMACOPEIA BRASILEIRA (2010) e na Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016g) são semelhantes e preconizados como ensaios de identificação de DS, Hep e OCS nas matérias-primas de heparina sódica suína, assim como, o método cromatográfico citada anteriormente.

Desta maneira, os resultados encontrados pelo método de RMN H^1 devem se assemelhar com os vistos para o método cromatográfico estudado, para que se possa atestar compatibilidade metodológica.

Métodos farmacopeicos possuem eficiência comprovada previamente e não justificaria prová-la mais uma vez neste trabalho, no entanto, a mudança da matriz a ser analisada requer pesquisas e adaptações nos métodos validados a fim de que se tenha efeito semelhante.

É o caso do produto acabado de heparina sódica, o qual possui excipientes em sua preparação que podem influenciar de forma prejudicial nos resultados obtidos. Dentre os diversos excipientes, os tampões salinos são os mais preocupantes quando a abordagem é a troca iônica, pois o sal pode competir pelos sítios de interação da fase estacionária com os analitos e interferir na separação cromatográfica.

Por isso, os métodos contidos nos compêndios oficiais associados à matéria-prima devem ser modificados e validados para o produto acabado. Essas mudanças são mais pronunciadas no preparo da amostra, a qual deve ser submetida à etapa de dessalinização para remoção desses componentes influenciadores.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analíticos para detectar impurezas e contaminantes em formulações de heparina e seus derivados

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver protocolo de preparo de amostra para avaliação qualitativa de heparina usando cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica com detecção detector de arranjo de fotodiodos (nas leituras de 202, 215, 254, 276 nm).
- Desenvolver e validar método analítico utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência para análise qualitativa de heparina, e de possíveis impurezas e contaminantes como o dermatan sulfato e condroitina supersulfatada em formulações de heparina e seus derivados utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica com detecção de arranjo de fotodiodos com prioridade na leitura de 202 nm, temperatura do Forno: 40°C, volume de injeção: 10 µL, tempo de corrida: 75 min, eluição por gradiente com fases móveis de fosfato de sódio e perclorato de sódio com fluxo de 0,22 mL/min;
- Avaliar a confiabilidade do método desenvolvido por comparação dos resultados obtidos com aqueles provenientes da RMN H¹;
- Desenvolver e validar método analítico para a determinação do teor da substância galactosamina em hexosaminas totais presentes em formulações de heparina e seus derivados utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica com detecção amperométrica pulsada, onde a célula amperométrica de prata obtinha programação específica para polissacarídeos, eluição isocrática com hidróxido de sódio com posterior etapa de limpeza com hidróxido de sódio e acetato de sódio, fluxo de 1,0 mL/ min, volume de injeção de 5 µL, temperatura de forno de 30°C e tempo de corrida: 11 min.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O preparo de amostra e as análises cromatográficas foram executados no Laboratório de Biológicos, Artigos e Insumos para a Saúde (LBAIS), setor de Imunobiológicos do Departamento de Química (DQ) / Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). As análises por RMN H¹ foram executadas na Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Laboratório de Tecido Conjuntivo – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF).

3.1 Equipamentos

Balança analítica com resolução de 0,01 mg, fabricante: Mettler Toledo, modelo: XS205 – Dual Range; Centrífuga, marca: Eppendorf, modelo: MiniSpin; Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Thermo, equipado com: Bomba Ultimate 3000, amostrador automático Ultimate 3000, compartimento de coluna Ultimate 3000, detector DADUltimate 3000; Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Thermo equipado com: Bomba de gradiente DIONEX ICS-5000 + SP, injetor DIONEX-AS AP, compartimento de coluna, detector eletroquímico DIONEX ICS-5000 + DC; Estufa, marca: VWR Scientific, modelo: 1400E; Speed Vac marca: Thermo, equipado com: Centrífuga, modelo: SPD131DDA, trap refrigerado, modelo: RVT4104, bomba de vácuo, modelo: 0FP400-115; Aparelho de Ressonância Magnética Nuclear, marca: BRUKER.

3.2 Materiais

Coluna analítica Carbo PacTM PA1, Fabricante: Dionex, Dimensões: 4x250 mm, Lote: 010-21-192; Coluna analítica Carbo PacTM PA20, Fabricante: Dionex, Dimensões: 3x150mm, Lote: 004-27-105; Coluna analítica IonPacTM AS11, Fabricante: Dionex, Dimensões: 2x250 mm, Lote: 011-15-063; Coluna HiTrapTM Desalting 5 mL, Fabricante: GE; Coluna Micro Bio Spin® 6, Fabricante: Bio Rad; Membrana com poros de 0,22 µm, Milipore Millex – GV Hydrophilic PVDF; Filtro de

Microcon YM-10, lote: R2PN8818, Fabricante: Merck Millipore; Pré-coluna AminoTrap™, Fabricante: Dionex, Dimensões: 3x30 mm, Lote: 011-15-131; Pré-coluna Borate-Trap™, Fabricante: Dionex, Dimensões: 4x50 mm, Lote: 010-04-068; Pré-coluna Carbo Pac™ PA20, Fabricante Dionex, Dimensões: 3x30 mm, Lote: 013-10-043; Pré-coluna IonPac™ AG11, Fabricante: Dionex, Dimensões: 2x50 mm, Lote: 011-15-063.

3.3 Padrões e reagentes

Acetato de Sódio PA, marca: Merck, lote: AM0583568335; Ácido clorídrico 37%, marca: Merck, lote: K38536817812; Ácido fosfórico PA, marca: Fluka, lote: BCBH6042V; Fosfato de sódio monobásico dihidratado PA, marca: Sigma-Aldrich, lote: SZBE1130V; Hidróxido de Potássio PA, marca: Fluka , lote: BCBC2101; Padrão de identificação de heparina sódica, Origem: USP, lote: G1L413; Padrão de heparina sódica para adequação do sistema, Origem: USP, lote: F0H211; Padrão de DS, Origem: USP, lote: G0M092; Padrão de OSCS, Origem: USP, lote: HOM191; Padrão de Galactosamina, Origem: USP, lote: G0L378; Padrão de Glicosamina Origem: USP, lote: G0M183; Perclorato de sódio monohidratado PA, marca:Fluka, lote: BCBQ5742V; Solução de hidróxido de sódio 50%, marca: Merck, lote: B0763493206. Óxido de deutério, marca: Sigma Aldrich; Sal ácido trimetilsililpropiónico deuterado de sódio (TSP), marca: Sigma Aldrich; Água deionizada.

3.4 Amostras

As amostras de produto acabado de Hep e HBMM foram adquiridas junto aos produtores, com o auxílio do Núcleo Técnico de Medicamentos Biológicos/INCQS.

Foram realizadas análises em sete amostras de heparina sódica, identificadas por números de acordo com lote, fabricante, origem, potência biológica e data de validade como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição das amostras de hep adquiridas para o estudo.

Amostra	Origem	Concentração	Excipientes	Apresentação
1		5000 UI/0,25 mL	Água para Injeção	Ampola contendo 0,25 mL
2		5000 UI/ mL		Frasco de vidro contendo 5 mL
3		5000 UI/ mL	Cloreto de sódio, álcool benzílico,	Frasco de vidro contendo 5 mL
4	Suína	5000 UI/ mL	água para injetáveis	Frasco de vidro contendo 5 mL
5		5000 UI/ mL		Frasco de vidro contendo 5 mL
6		5000 UI/0,25 mL	Água para Injeção	Ampola contendo 0,25 mL
7		5000 UI/0,25 mL	Água para Injeção	Ampola contendo 0,25 mL

Fonte: (DO AUTOR, 2018).

3.4.1 Desenvolvimento de protocolo de dessalinização de amostra

Três protocolos de análise foram testados para dessalinização das amostras, utilizando a coluna HiTrap™, o ultra filtro de Microcon® e a coluna Micro Bio-Spin®.

3.4.1.1 Protocolo de dessalinização com a coluna HiTrap™

A figura 14 evidencia o sistema montado de seringa mais a coluna HiTrap™, onde o analito é inserido em uma seringa e esta é então acoplada na coluna, a eluição ocorre por meio da pressão exercida pelo êmbolo da seringa.

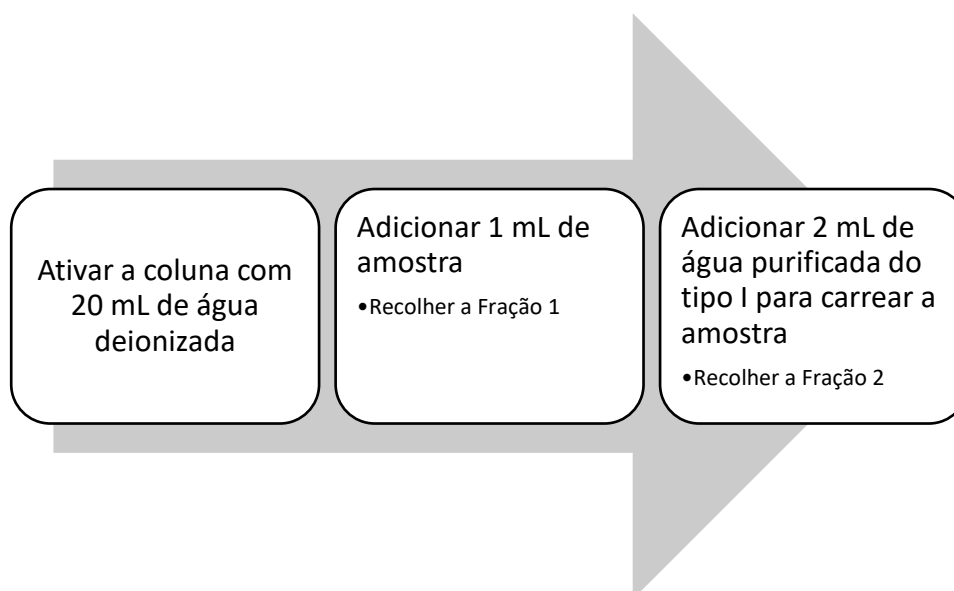
Figura 14 - Sistema montado com a coluna HiTrap™.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

As etapas de dessalinização com a coluna HiTrap™ são vistas na figura 15, por se tratar de uma coluna de exclusão molecular, espera-se que a heparina interaja mais com a fase estacionária, sendo necessário utilizar a água para carrear o analito.

Figura 15 - Etapas de dessalinização com a coluna HiTrap™.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

A fração de interesse é a de número 2, no entanto foram preparadas duas soluções, uma com a fração 1 e a outra com a fração 2.

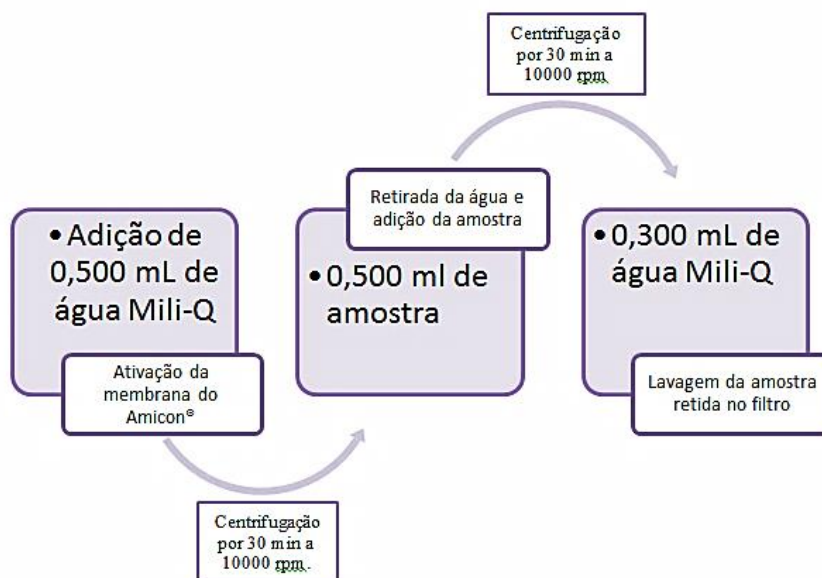
3.4.1.2 Protocolo de dessalinização com o ultra filtro Microcon®

A Figura 16 apresenta o esquema do processo de dessalinização utilizando o ultra-filtro de Microcon®. Na primeira etapa, o ultra filtro é ativado com água deionizada para saturar os poros, a fim de que se possa adicionar a amostra para posteriormente ser submetida à centrifugação.

Devido o ultra filtro promover uma recuperação rápida da amostra, concentrando-a, os excipientes contidos na preparação transpassam a membrana e são armazenados no eppendorf, enquanto que a amostra fica retida devido a faixa de separação do ultra-filtro ser igual a 10 kDa (Figura 17).

Na última etapa a amostra é lavada com água deionizada. De forma a avaliar a eficiência deste procedimento foi realizado testes com uma, duas e cinco etapas de lavagem consecutivas.

Figura 16 - Esquema do processo de dessalinização a partir de filtros de Microcon®.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 17 - Sistema de dessalinização montado composto de eppendorf de 1,5 mL e Microcon® de 0,5 mL, após o processo a amostra fica retida no Microcon® enquanto os sais transpassam o filtro.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

3.4.1.3 Protocolo de dessalinização com a coluna Bio Spin®

O fenômeno de separação da coluna Micro Bio Spin® é de exclusão molecular, portanto, os excipientes com pequenas moléculas ficam retidos nos poros da coluna e a Hep com maior facilidade de eluição pode ser recolhida facilmente no eppendorf após o processo de centrifugação (Figura 18).

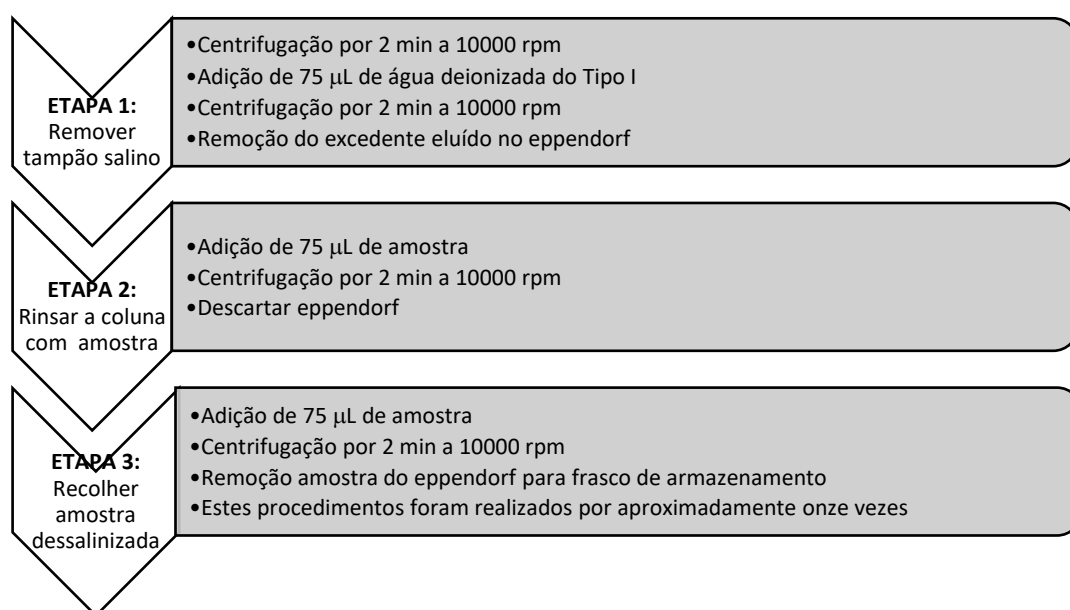
A figura 19 representa as etapas de dessalinização submetidas na amostra, e neste caso, não há necessidade de lavar o sistema com água. A coluna satura com 75 μ L de amostra, portanto, é necessário realizar este procedimento algumas vezes para que se tenha o volume necessário para preparar a solução.

Figura 18 - Sistema de dessalinização pela coluna Micro Bio-Spin®



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 19 - Esquema de dessalinização com coluna Micro Bio-Spin®



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

O preparo de solução a partir dos três tipos de dessalinização seguiu a conversão teórica apresentada na THE UNITED (2012), de que 180 UI equivale a 1 mg de heparina sódica. Em todos os casos, foi submetido 20 mg/mL de padrão USP de heparina sódica às mesmas condições que às amostras.

3.5 Método cromatográfico para identificação de heparina, dermatan sulfato e condroitina supersulfatada em formulações de heparina sódica suína .

3.5.1 Perfil cromatográfico de DS, Hep e OSCS

Foram preparadas três soluções padrão USP distintas: 1 mL de Hep Sódica 20 mg/mL; 1 mL de DS 1 mg/mL e 1 mL de OSCS 1 mg/mL, conforme figura 20.

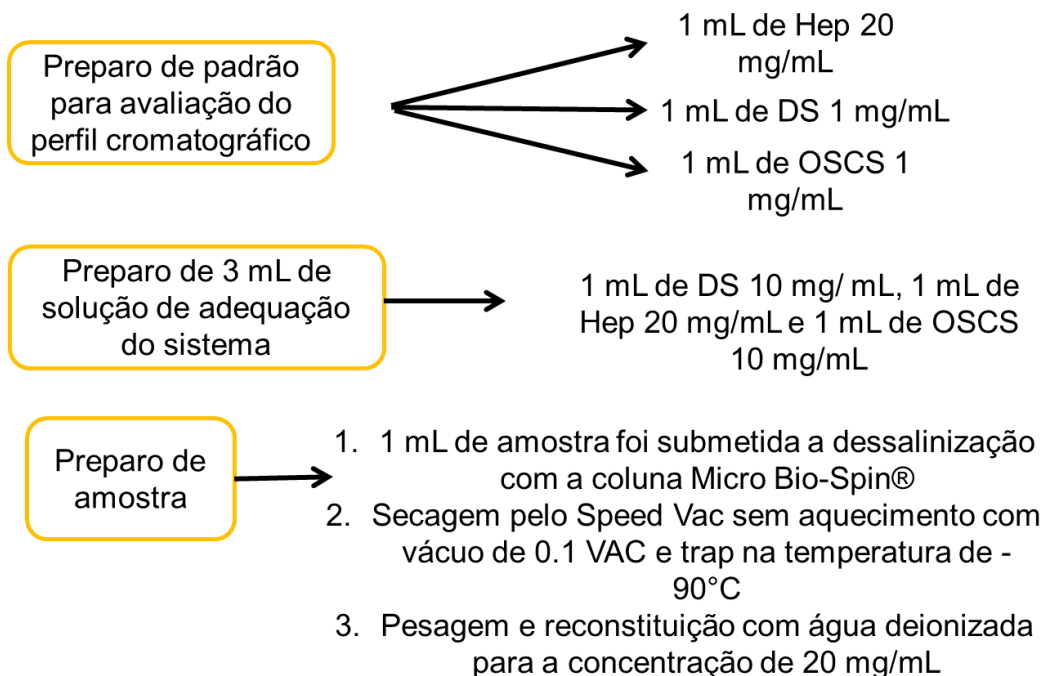
3.5.2 Preparo de solução de adequação do sistema

Foi preparada 3 mL de solução padrão USP contendo 1 mL de DS, 1 mL de Hep e 1 mL de OSCS nas concentrações de 10; 20; 10 mg/mL, respectivamente. A solução foi diluída em água deionizada, e seis injeções foram realizadas conforme figura 20.

3.5.3 Protocolo de preparo da amostra com procedimento da coluna Micro Bio-Spin®

1 mL de amostra foi submetida a dessalinização com a coluna Micro Bio-Spin®, seguida de secagem pelo aparelho Speed Vac sem aquecimento com vácuo de 0,1 torr e trap na temperatura de -90°C. O sólido seco foi pesado e reconstituído com água deionizada para a concentração de 20 mg/mL, conforme figura 20.

Figura 20 - Esquema do preparo de solução padrão para avaliação do perfil cromatográfico; Preparo da solução de adequação do sistema analítico e; Preparo da amostra para o método de identificação cromatográfica.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

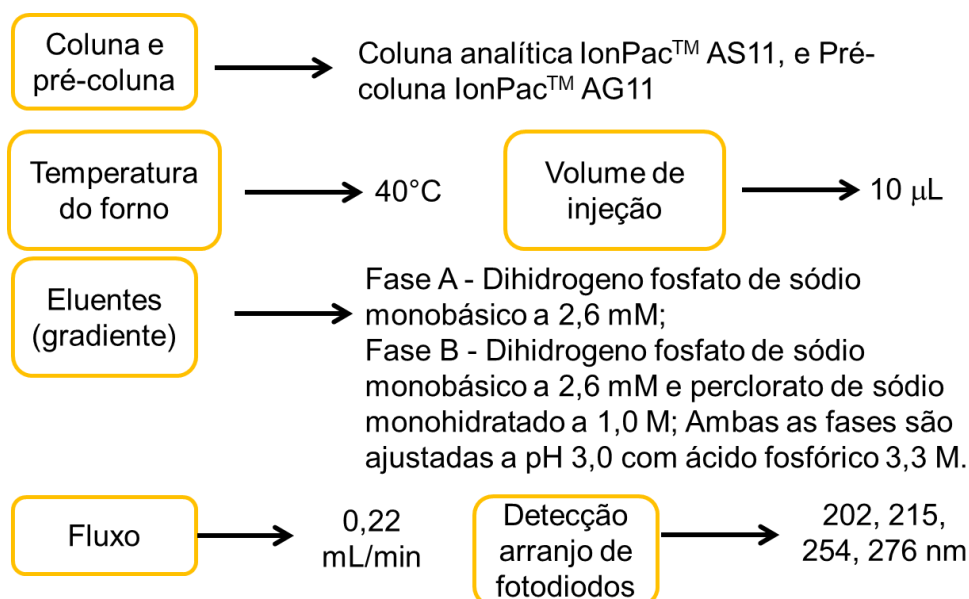
3.5.4 Condições Cromatográficas baseadas na Farmacopeia americana (THE UNITED, 2012)

A Farmacopeia americana mais atualizada (THE UNITED, 2016g) difere da THE UNITED (2012) pelo uso de pré-coluna e coluna com especificações de dimensão, tamanho de partículas e diâmetro de poros, no entanto a fase estacionária é semelhante. Como a pré-coluna e coluna à disposição eram as mesmas encontradas na farmacopeia americana (THE UNITED, 2012), basearemos as condições cromatográficas a esta versão do compêndio.

Coluna analítica IonPac™ AS11, Fabricante: Dionex, Dimensões: 2x250 mm, Lote: 011-15-063; Pré-coluna IonPac™ AG11, Fabricante: Dionex, Dimensões: 2x50 mm, Lote: 011-15-063; Temperatura do Forno: 40°C; Eluentes: Fase A - Dihidrogeno fosfato de sódio monobásico a 2,6 mM; Fase B - Dihidrogeno fosfato de sódio monobásico a 2,6 mM e perclorato de sódio monohidratado a 1,0 M; Ambas as fases

são ajustadas a pH 3,0 com ácido fosfórico 3,3 M. Após devem ser filtradas e degaseificadas; Modo de eluição: Gradiente (Tabela 2); Fluxo: 0,22 mL/ min; Volume de injeção: 10 μ L; Detecção: UV em 202, 215, 254, 276 nm; Tempo de Corrida: 75 min. As condições cromatográficas foram resumidas na figura 21.

Figura 21 - Condições cromatográficas do método de identificação.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Tabela 2 - Eluição programada por gradiente.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	80	20
60	10	90
61	80	20
75	80	20

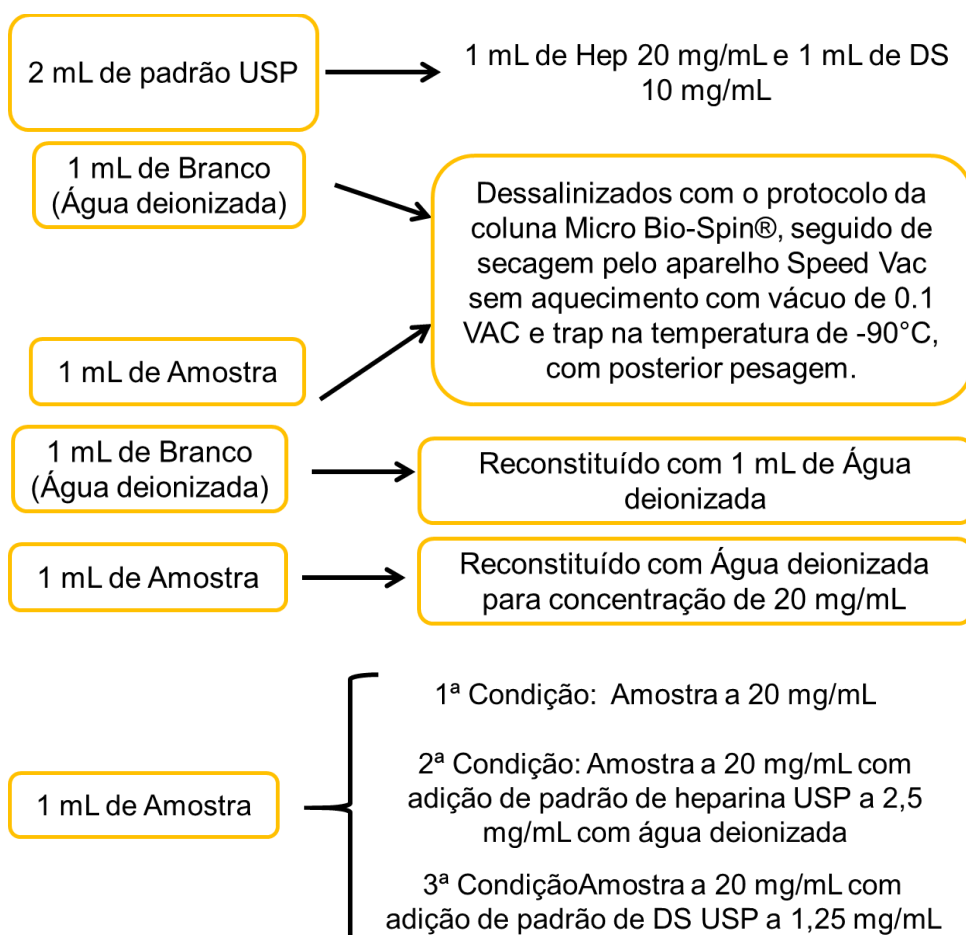
Fonte: (THE UNITED, 2012).

Todas as soluções preparadas foram injetadas em triplicata no cromatógrafo de alta eficiência e os resultados obtidos processados no software Chromeleon (c) Dionex 1996-2006, versão 6.80.

3.5.5 Seletividade

Para o teste de seletividade foi preparado branco (água deionizada), padrão de heparina 20 mg/mL e de DS 10 mg/mL e amostra em três condições distintas: Amostra a 20 mg/mL (1ª Condição); Amostra a 20 mg/mL com adição de padrão de heparina USP a 2,5 mg/mL (2ª Condição); e Amostra a 20 mg/mL com adição de padrão de DS USP a 1,25 mg/mL (3ª Condição). O branco e a amostra foram dessalinizados seguindo o protocolo da coluna Micro Bio Spin®. Para cada solução foram realizadas três injeções, e os tempos de retenção foram avaliados. Os procedimentos foram resumidos na figura 22.

Figura 22 - Procedimento experimental para validação do método cromatográfico de identificação.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

3.6 Método para identificação de heparina, dermatan sulfato e condroitina supersulfatada em formulações de heparina sódica suína a partir da ressonância magnética nuclear.

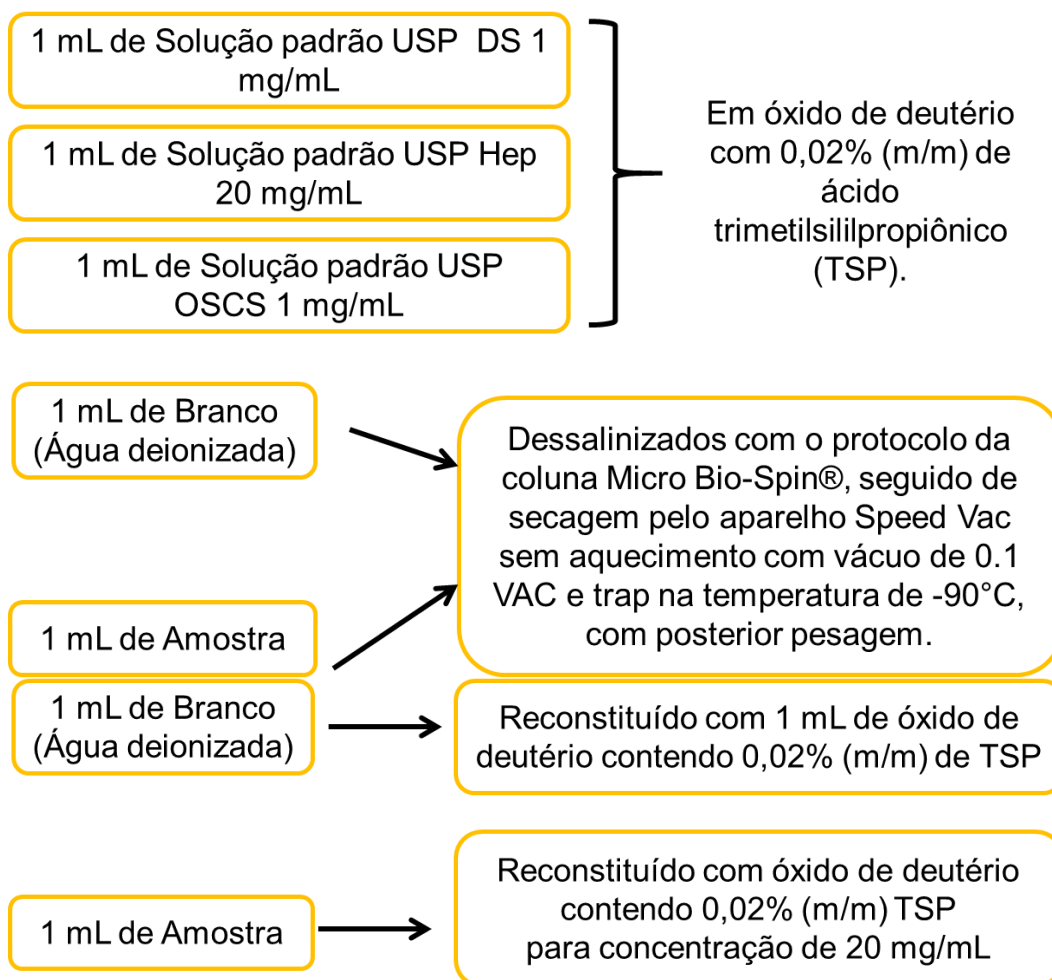
3.6.1 Preparo de Solução Padrão

Foi preparado 1 mL de Solução Padrão de DS, Hep e OSCS nas concentrações de 1 mg/mL, 20 mg/mL e 1 mg/mL em óxido de deutério com 0,02% (m/m) de ácido trimetilsililpropiónico (TSP), conforme figura 23.

3.6.2 Preparo de Soluções Amostra e Branco

A solução branco composta de água deionizada, assim como as amostras foram dessalinizadas a partir do protocolo da coluna Micro Bio-Spin®, seguido de secagem pelo aparelho Speed Vac sem aquecimento com vácuo de 0,1 torr e trap na temperatura de -90°C. Por último, as soluções amostra e branco foram pesadas e reconstituídas com óxido de deutério contendo 0,02% (m/m) de ácido trimetilsililpropiónico (TSP) para a concentração de 20 mg/mL. Procedimentos estes resumidos na figura 23.

Figura 23 - Procedimentos experimentais para o método espectrométrico.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

3.6.3 Condições Espectrométricas

As condições espectrométricas foram baseadas na Farmacopeia Americana (THE UNITED, 2016g), sendo os parâmetros ajustados conforme tabela 3.

Tabela 3 - Condições espectrométricas baseadas na Farmacopeia Americana (THE UNITED, 2016g).

Modo	RMN pulsado com transformação de Fourier (TF)
Frequência	Acima de 500 MHz
Temperatura	25°C
Decaimento livre da indução (FID)	Acima de 16 scans, pulso de 90° e delay de 20-s

Fonte: (DO AUTOR, 2018).

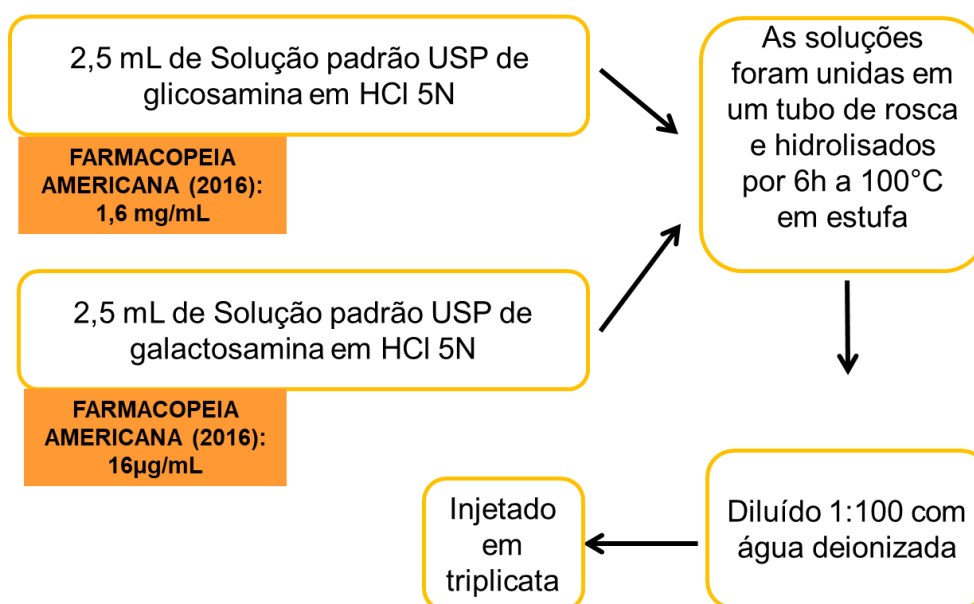
O sinal de TSP foi estabelecido como zero ppm e os espectros foram coletados em uma janela espectral de 10 a 2 ppm e os resultados interpretados.

3.7 Método para a determinação do limite de galactosamina em hexosaminas totais presentes em formulações de heparina sódica suína.

3.7.1 Preparo de solução de adequação do sistema

Para o preparo da solução de adequação do sistema foram feitas duas soluções: Solução padrão USP de 1,6 mg/mL glicosamina em 5N ácido clorídrico e solução padrão USP de 16 µg/mL galactosamina em 5N de ácido clorídrico. Em um tubo de ensaio com rosca, são adicionados volumes iguais de solução de glicosamina e galactosamina, e então esta solução final é denominada adequação do sistema. Por último, 5 mL desta solução são hidrolisados por 6h a 100°C e após arrefecido, diluído com água deionizada na proporção de 1:100. A injeção foi feita em triplicata e a figura 24 resume os procedimentos descritos.

Figura 24 - Procedimento experimental para o preparo de solução de adequação do sistema para o método de ensaio limite.

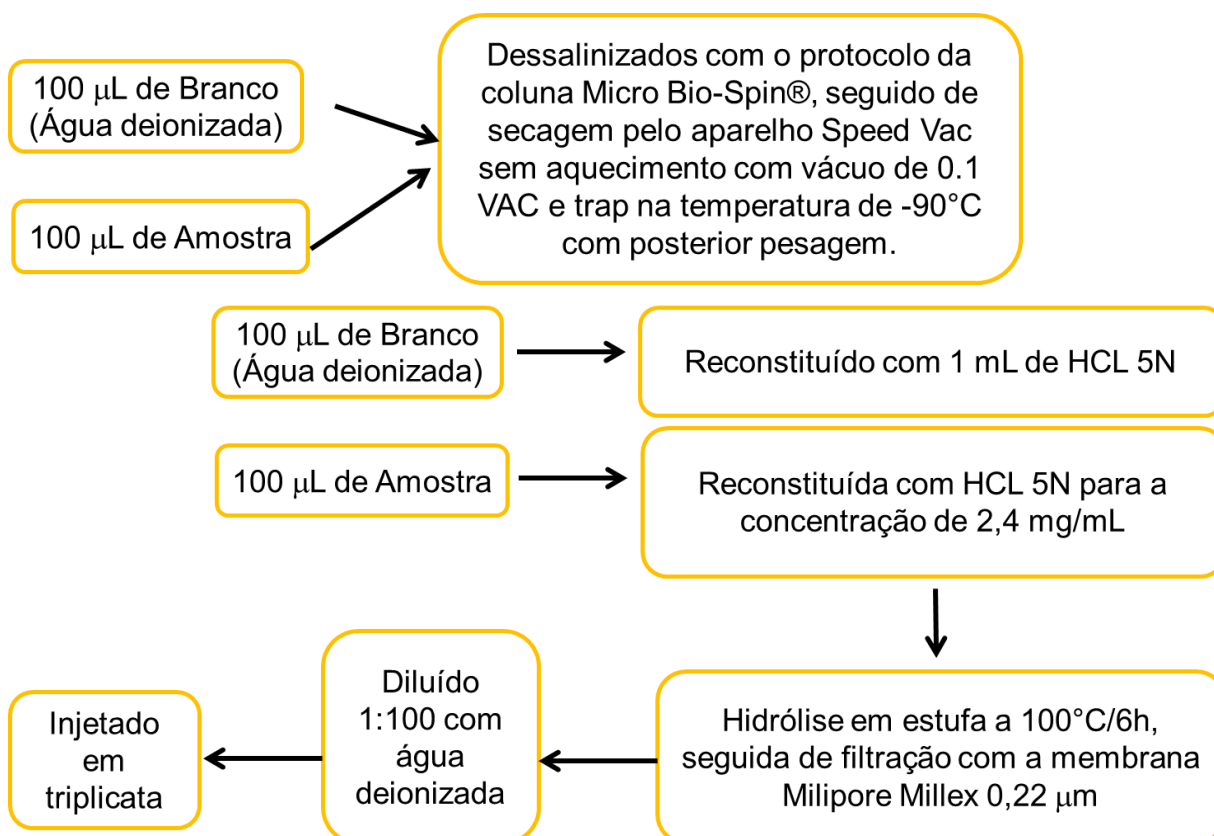


Fonte: (DO AUTOR, 2018).

3.7.2 Protocolo de preparo da amostra com procedimento da coluna Micro Bio-Spin®

As amostras foram dessalinizadas a partir do protocolo da coluna Micro Bio-Spin®, secadas pelo aparelho Speed Vac sem aquecimento com vácuo de 0,1 torr e trap na temperatura de -90°C ; pesadas e reconstituídas conforme a proporção da THE UNITED (2016) cuja relação é de 12 mg de heparina sódica para 5 mL de 5N de ácido clorídrico. Estas soluções foram hidrolisadas por 6h a 100°C e ao esfriarem a temperatura ambiente, foram filtradas pela membrana Milipore Millex 0,22 μm e após diluídas com água deionizada na proporção de 1:100, de acordo com a figura 25.

Figura 25 - Procedimento experimental para o preparo de solução de branco e amostra para o método de ensaio limite.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

3.7.3 Condições Cromatográficas baseadas na Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016)

Coluna analítica Carbo Pac™ PA20, Fabricante: Dionex, Dimensões: 3x150mm, Lote: 004-27-105; Pré-coluna Amino-Trap™, Fabricante: Dionex, Dimensões: 3x30 mm, Lote: 011-15-131; Pré-coluna Borate-Trap™, Fabricante: Dionex, Dimensões: 4x50 mm, Lote: 010-04-068; Pré-coluna Carbo Pac™ PA20, Fabricante Dionex, Dimensões: 3x30 mm, Lote: 013-10-043; Temperatura do Forno: 30°C; Eluentes: Fase de eluição - 14 mM Hidróxido de potássio, Fase de limpeza – 100 mM de Hidróxido de potássio, Ambas as fases foram filtradas e degaseificadas; Modo de eluição: Isocrático (Eluição por 10 min com fase de eluição, limpeza da coluna por 10 min com fase de limpeza e equilíbrio com 10 min de fase de eluição entre cada injeção; Fluxo: 0,50 mL/ min; Volume de injeção: 10 µL; Detecção: Amperométrico Pulsado, seguindo a programação da Tabela 4.

Tabela 4 - Programação da célula amperométrica de prata/ouro específica para polissacarídeos.

Nível	Tempo (min)	Potencial (V)	Integração
1	0,00	+0,1	-
2	0,20	+0,1	Começo
3	0,40	+0,1	Final
4	0,41	-2,0	-
5	0,42	-2,0	-
6	0,43	+0,6	-
7	0,44	-0,1	-
8	0,50	-0,1	-

Fonte: (THE UNITED, 2016)

Todas as soluções preparadas foram injetadas em triplicata no cromatógrafo de alta eficiência e os resultados obtidos processados no software Chromeleon (c), versão 7.00.

3.7.4 Condições Cromatográficas baseadas no trabalho de ITOH (2013)

Coluna analítica Carbo Pac™ PA1, Fabricante: Dionex, Dimensões: 4x250 mm, Lote: 010-21-192; Pré-coluna Amino-Trap™, Fabricante: Dionex, Dimensões: 3x30 mm, Lote: 011-15-131; Pré-coluna Borate-Trap™, Fabricante: Dionex, Dimensões: 4x50 mm, Lote: 010-04-068; Temperatura do Forno: 30°C; Eluentes: Fase de eluição – 8 mM Hidróxido de sódio, Fase de limpeza – 1 M de Acetato de Sódio, ambas as fases foram filtradas e degaseificadas; Modo de eluição: Isocrático (Eluição por 11 min com 8mM de hidróxido de sódio. A limpeza da coluna é realizada conforme mostrado na tabela 5 com a proporção de 60% de 8mM de hidróxido de sódio e 40% de 1M de acetato de sódio, entre as injeções é feito equilíbrio com 10 min de fase de eluição); Fluxo: 1,0 mL/ min; Volume de injeção: 5 µL; Detecção: Amperométrico Pulsado, seguindo a programação da Tabela 6; Tempo de Corrida: 11 min.

Tabela 5 - Programação da eluição.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
-10,0	100	0
0	100	0
11,0	100	0
11,1	100	0
36,1	60	40
50,1	60	40
50,2	100	0
60,0	100	0

Fonte: (ITOH, 2013).

Tabela 6 - Programação da célula amperométrica de prata/ouro específica para polissacarídeos.

Nível	Tempo (min)	Potencial (V)	Integração
1	0,00	+0,1	-
2	0,20	+0,1	Começo
3	0,40	+0,1	Final
4	0,41	-2,0	-
5	0,42	-2,0	-
6	0,43	+0,6	-
7	0,44	-0,1	-
8	0,50	-0,1	-

Fonte: (ITOH, 2013).

As amostras foram injetadas em triplicata no cromatógrafo de alta eficiência e os resultados obtidos processados no software Chromeleon (c) 7.0. A tabela 7 evidencia as diferenças experimentais dos dois métodos de ensaio limite abordados neste trabalho.

Tabela 7 - Diferenças entre os métodos de ensaio limite.

Condições cromatográficas	Farmacopeia Americana (2016)	ITOH (2013)
Coluna e pré-coluna	Coluna analítica Carbo Pac TM PA20, Pré-coluna Amino-Trap TM ; Pré-coluna Borate-Trap TM e Pré-coluna Carbo Pac TM PA20	Coluna analítica Carbo Pac TM PA1, Pré-coluna Amino-Trap TM ; e Pré-coluna Borate-Trap TM
Temperatura do forno		30°C
Volume de injeção	10 mL	5 mL
Eluição isocrática	KOH 14 mM	NaOH 8mM
Etapa de limpeza	KOH 100 mM	60% NaOH 8mM + 40% NaAc 1M
Fluxo	0,50 mL/min	1,00 mL/min
Deteção	Amperométrica pulsada com programação específica para polissacarídeos	

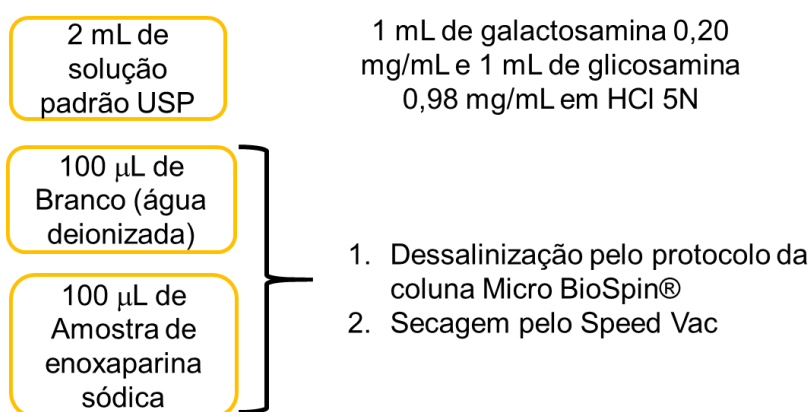
Fonte: (DO AUTOR, 2018).

3.7.5 Seletividade

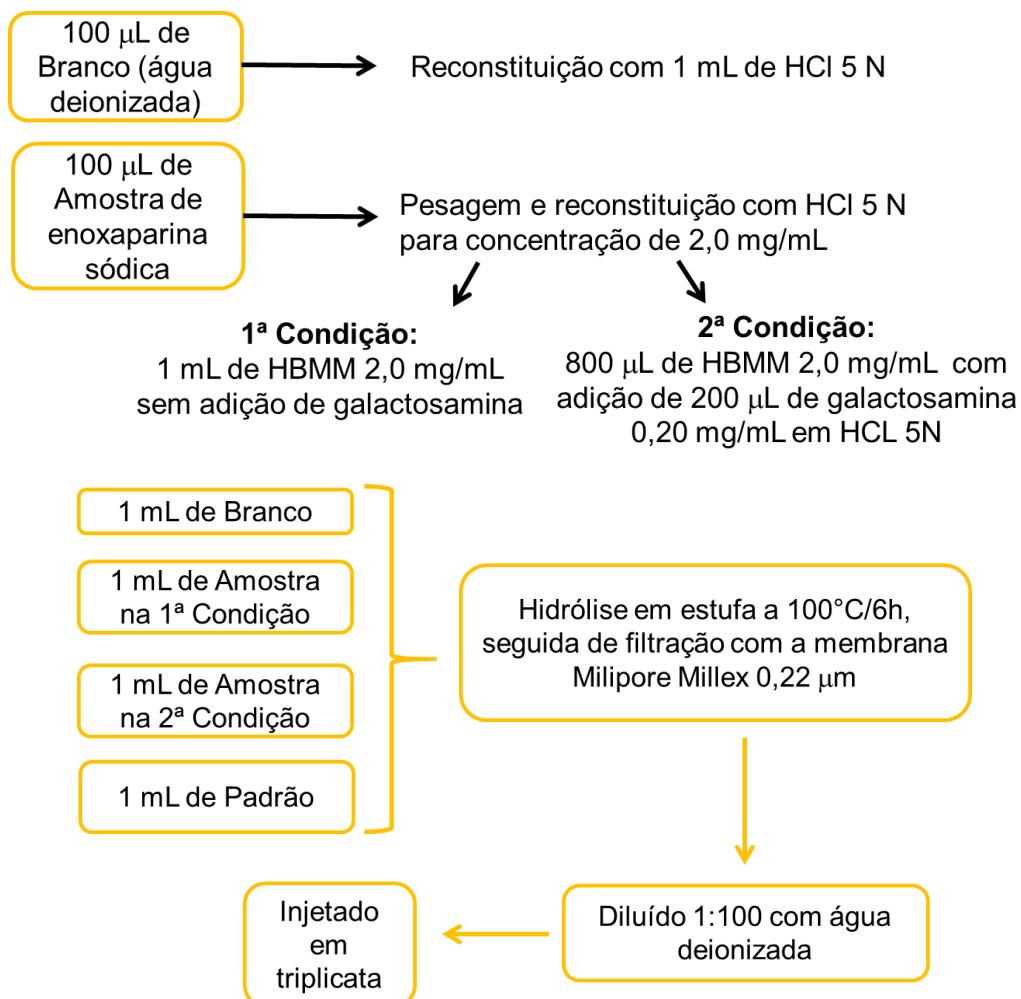
Para este ensaio foi utilizado amostra de enoxaparina sódica em duas condições distintas: 2,0 mg/mL HBMM sem adição de galactosamina e com adição de 0,20 mg/mL de galactosamina. E estas soluções foram comparadas com a solução padrão de 0,20 mg/mL de galactosamina e 0,98 mg/mL de glicosamina e com o branco composto de água deionizada.

A amostra e o branco foram dessalinizados pelo protocolo da coluna Micro Bio Spin®, secados no Speed Vac, com pressão 0,1 Vac, temperatura ambiente, trap a -90°C por 4h. E então foi ressuspensos em ácido clorídrico 5N para concentração de 2,0 mg/mL, os padrões também foram diluídos em HCl 5N. Todas as soluções foram hidrolisadas a 100°C por 6h, arrefecidas a temperatura ambiente e diluídas 1:100 com água deionizada, posteriormente foram injetadas em triplicata e os tempos de retenção foram avaliados. A figura 26 evidencia os procedimentos de forma resumida.

Figura 26 - Procedimento experimental para análise de seletividade do método cromatográfico de ensaio limite



Continuação da figura 26



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

3.7.6 Teste de limite de detecção (LD)

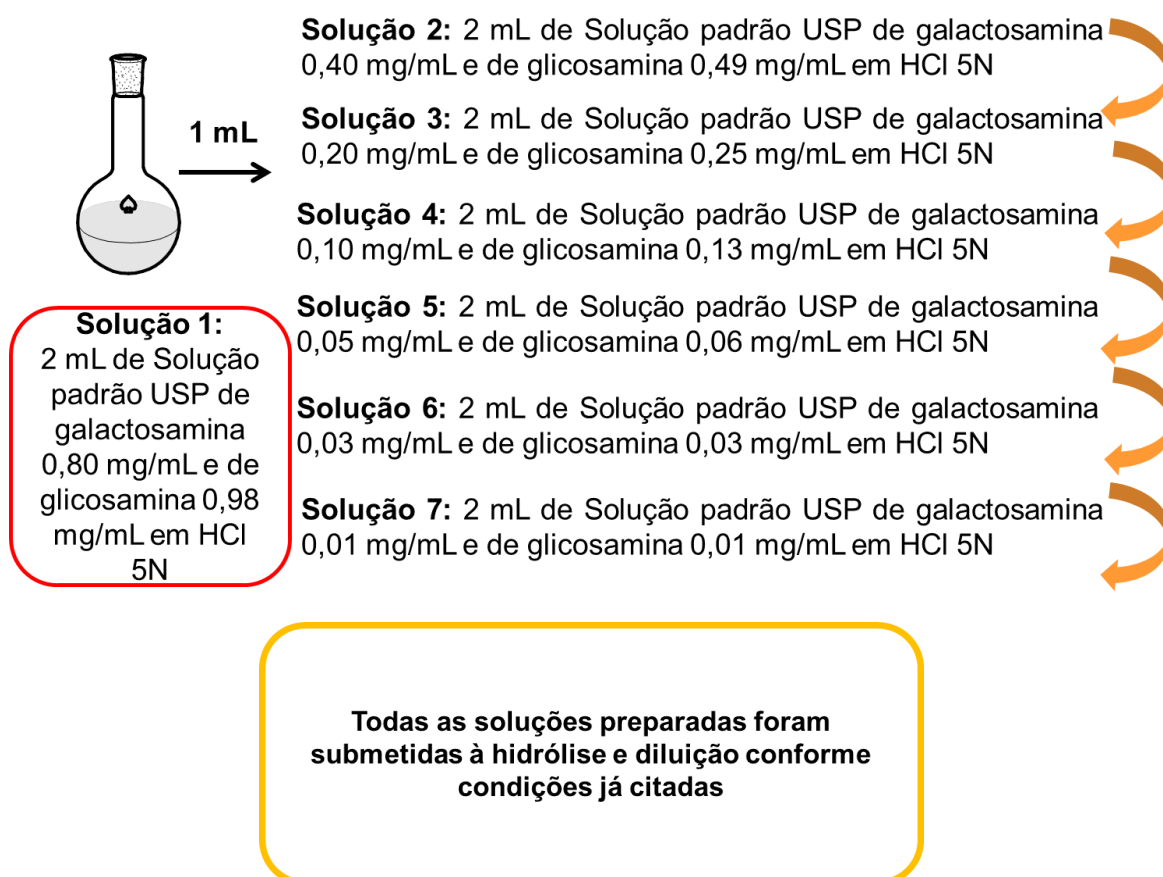
Foi preparada a solução 1, contendo 0,80 mg/mL de galactosamina e 0,98 mg/mL de glicosamina em ácido clorídrico 5N e a partir desta, foram realizadas diluições seriadas de acordo com a tabela 8. Posteriormente, seguiu o processo de hidrólise a 100°C por 6 horas. Após este período as soluções foram arrefecidas e diluídas em água deionizada na proporção 1:100. Para cada concentração foram realizadas três injeções, na figura 27 é possível avaliar o procedimento descrito de forma resumida.

Tabela 8 - Soluções preparadas de padrão de galactosamina e glicosamina.

Solução	Padrão de galactosamina	Padrão de glicosamina
1	0,80 mg/mL	0,98 mg/mL
2	0,40 mg/mL	0,49 mg/mL
3	0,20 mg/mL	0,25 mg/mL
4	0,10 mg/mL	0,13 mg/mL
5	0,05 mg/mL	0,06 mg/mL
6	0,03 mg/mL	0,03 mg/mL
7	0,01 mg/mL	0,02 mg/mL

Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 27 - Procedimento experimental para análise do LD para o método cromatográfico de ensaio limite.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

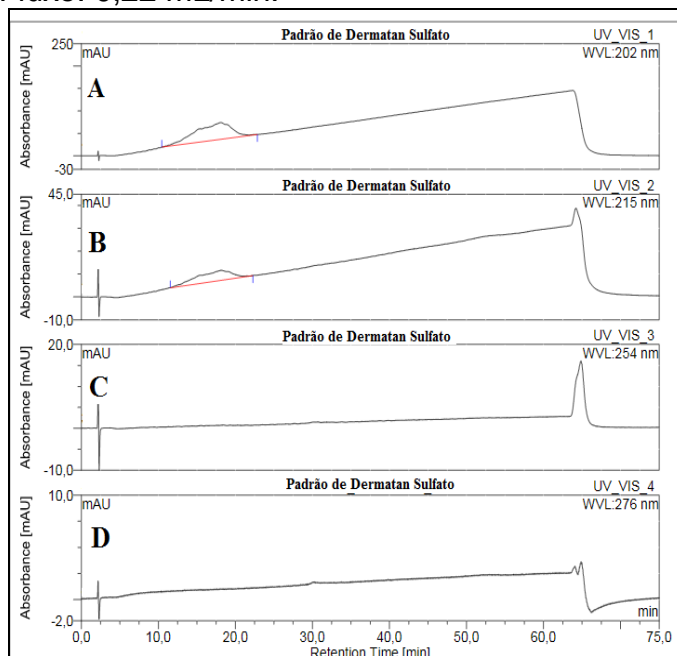
Os protocolos de preparo de amostra foram analisados no método cromatográfico de identificação de heparina, dermatan sulfato e condroetina supersulfatada

4.1 Método para identificação cromatográfica de heparina, dermatan sulfato e condroetina supersulfatada em formulações de heparina sódica suína

O método contido na THE UNITED (2012) referente a matéria-prima de heparina sódica foi utilizado como base para esta pesquisa, o objetivo desta análise foi identificar a presença de DS, Hep e OSCS, cuja ordem de eluição é 20, 30, e 50 min, para dermatan sulfato, heparina e condroetina supersulfatada, respectivamente, segundo o compêndio.

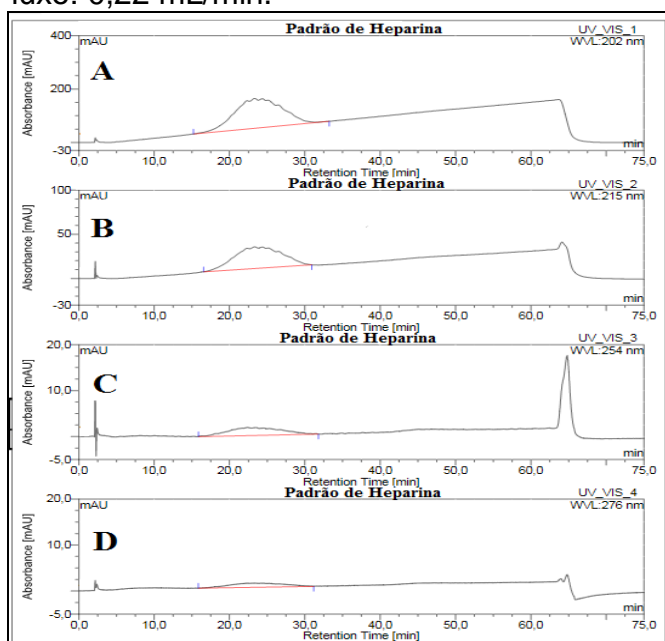
Os resultados deste trabalho apresentaram a mesma ordem de eluição que a descrita na farmacopeia americana (THE UNITED, 2012) com pequenas alterações no tempo de retenção, sendo 18 min para DS, 25 min para hep e 44 min para OSCS, como podem ser observados nos cromatogramas das figuras 28-a,29-a e 30-a; respectivamente.

Figura 28 - Cromatograma referente a injeção de 10 μ L do padrão USP de DS 1 mg/mL nos comprimentos de onda de 202 nm (A), 215 nm (B), 254 nm (C), 276 nm (D). Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 μ L, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



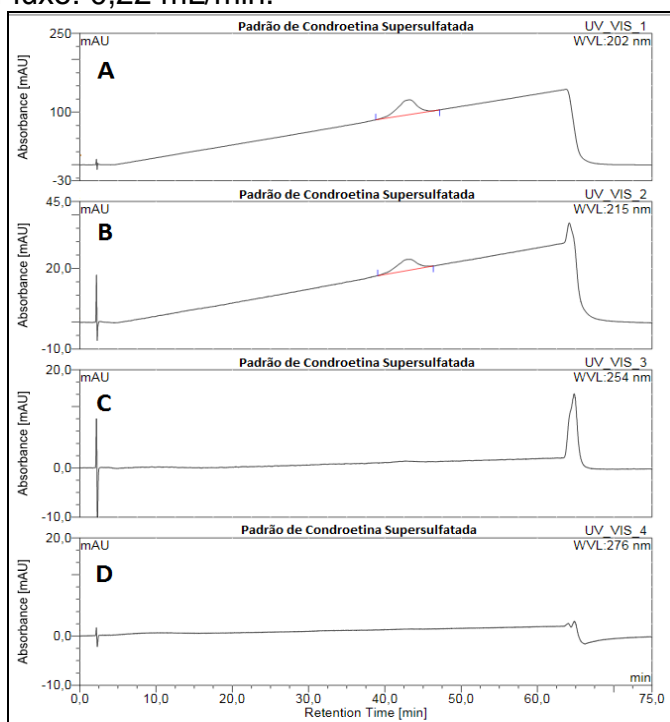
Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 29 - Cromatograma referente a injeção de 10 μ L do padrão USP de Hep 20 mg/mL nos comprimentos de onda de 202 nm (A), 215 nm (B), 254 nm (C), 276 nm (D). Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 μ L, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 30 - Cromatograma referente a injeção de 10 μ L do padrão USP de OSCS 1 mg/mL nos comprimentos de onda de 202 nm (A), 215 nm (B), 254 nm (C), 276 nm (D). Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 μ L, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

O DS possui grau de sulfatação menor do que a Hep, por isso sua afinidade com a coluna cromatográfica é menor também, enquanto a OSCS, por ser altamente sulfatada, elui por último devido a quantidade de grupos sulfatos estar diretamente relacionada a maior afinidade com a coluna cromatográfica (HASHII, 2010).

Na faixa de 202 a 215 nm pode ser observado um perfil cromatográfico característico aos GAGs, refletindo sua natureza heterogênea, formada por misturas complexas de moléculas com grande variação na massa molar. Embora os números de dissacarídeos variem de cadeia para cadeia dando origem a uma grande dispersão de moléculas com massa molar distinta, as propriedades químicas continuam semelhantes, promovendo uma eluição com um único sinal extremamente assimétrico (TREHY, 2009).

A detecção em 202 nm é uma desvantagem deste método, pois outras espécies além das substâncias de interesse podem absorver interferindo na

eficiência do método. É o caso do perclorato de sódio contido na fase móvel e responsável pela crescente linha de base (CHMIELEWSKI, 2011).

A substituição de perclorato de sódio por cloreto de sódio na fase móvel, por exemplo, não altera a inclinação, permanecendo semelhante perfil cromatográfico como visto no trabalho de TREHY (2009).

Ainda que comprimentos de ondas maiores diminuam a inclinação na linha de base, é possível reparar a diminuição da sensibilidade na detecção das espécies de interesse. A literatura aponta que o uso do detector de UV nos comprimentos de onda inferiores a 220 nm causa um aumento substancial da linha de base, em contrapartida, leituras acima deste comprimento de onda ocasionam perda significativa de sensibilidade para as espécies avaliadas em virtude da diminuição de absorvidade. Os resultados apresentados neste trabalho, na faixa de 254 e 276 nm, comprovam a diminuição do fator resposta para os analitos (TREHY, 2009; CHMIELEWSKI, 2011)

4.1.1 Desenvolvimento de protocolo de preparo de amostra para a análise cromatográfica

A análise dos três protocolos de preparo de amostra foi feita com o método para identificação de heparina, dermatan sulfato e condroitina supersulfatada.

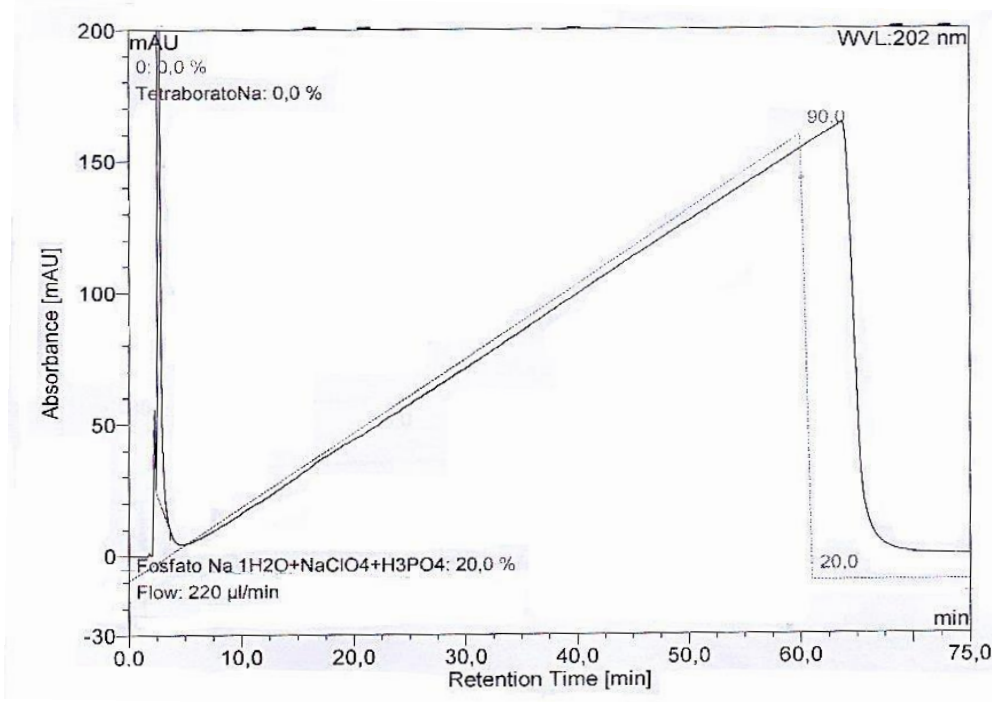
4.1.1.1 Protocolo de preparo de amostra com a coluna HiTrap™

A coluna HiTrap™ é recheada por gel de Sephadex™ G-25, a qual promove separação através do fenômeno de exclusão molecular com um limite de exclusão na faixa de 5 kDa, ou seja, moléculas menores são retidas com maior facilidade e as maiores são eluídas rapidamente. Logo, espera-se que a heparina, cuja massa molar varia entre 12-15 kDa, seja separada dos demais excipientes de forma bastante eficiente (GE HEALTHCARE, 2007).

A figura 31 mostra o cromatograma da amostra 4 testada com o procedimento da coluna HiTrap™ e apenas um sinal cromatográfico foi observado para a fração 2, no tempo de 2 min. Este perfil é semelhante ao visto para o padrão de heparina

sódica submetido às mesmas condições, sendo o sinal em 2 min com menor intensidade.

Figura 31 - Cromatograma referente à amostra 4 testada com o procedimento da coluna HiTrap™. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

HASHII (2010) fez uma abordagem de análise de GAGs por cromatografia de fraca troca iônica com detecção a 202 nm e em seus cromatogramas observou-se pequenos sinais em torno de 2 min, que não foram discutidos. Considerando que seus estudos foram feitos com matéria-prima de heparina cálcica, sugere-se que os excipientes do produto acabado analisado no presente trabalho podem contribuir com a intensidade do sinal nessa região.

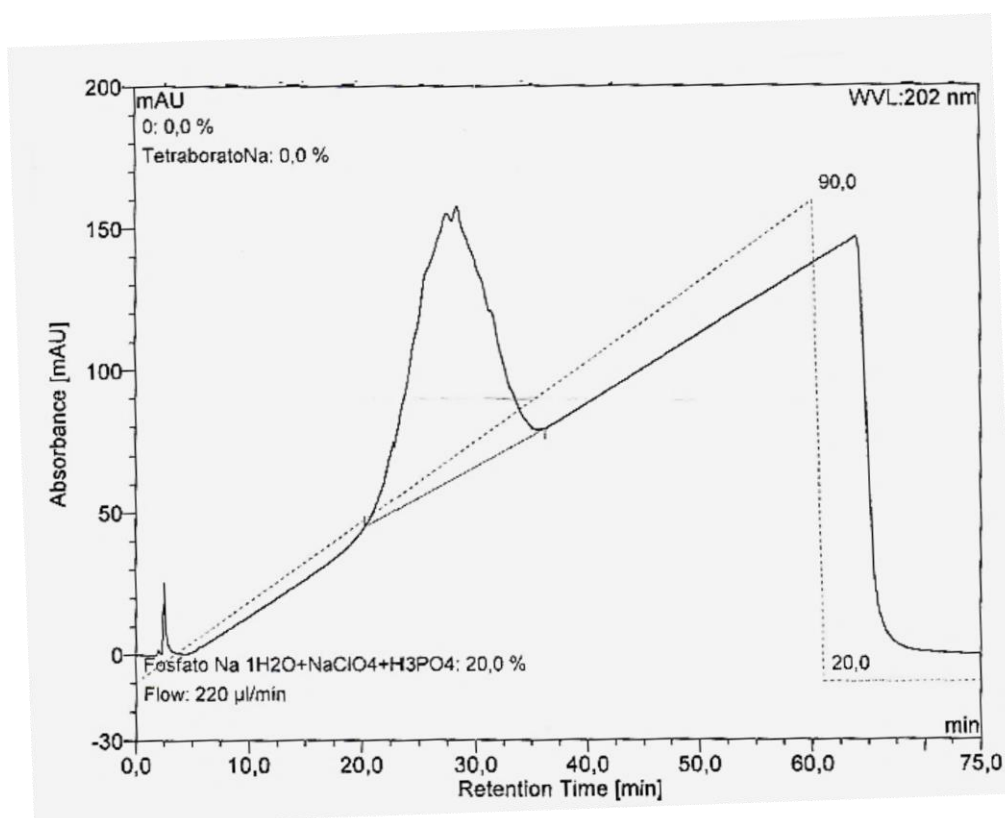
Com o objetivo de descartar este procedimento, avaliou-se a fração 1 e esta apresentou sinais cromatográficos com pouca intensidade próximo ao volume morto do sistema cromatográfico, não sendo possível identificar o pico referente a heparina. Provavelmente a coluna retém o analito e a água não é uma fase móvel eficiente para eluição. Segundo o protocolo GE HEALTHCARE (2007), para substâncias muito carregadas pode haver a necessidade do uso de um tampão

salino para a eluição das espécies, contrapondo o objetivo do processo que é retirar os sais.

4.1.1.2 Protocolo de preparo de amostra com os ultra-filtros de Microcon®

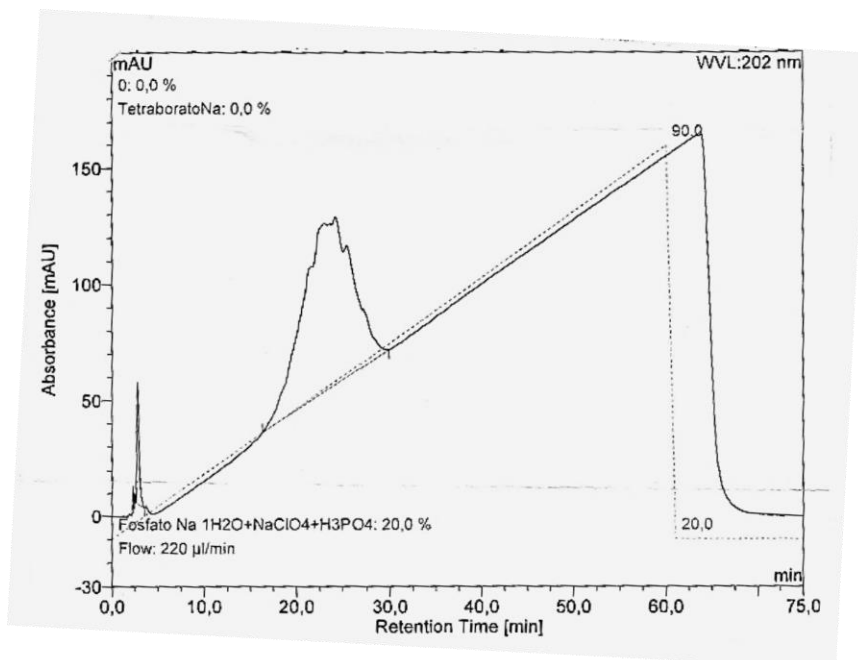
O teste com o ultra-filtro de Microcon® foi realizado com padrão sem tratamento (Figura 32) e com uma lavagem (Figura 33), além de ser subdividido em três condições para a amostra: Volumes iguais da mesma amostra foram submetidos a uma, duas e cinco etapas de lavagens, conforme figuras 34, 35 e 36, respectivamente.

Figura 32 - Cromatograma do padrão de heparina sem tratamento. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



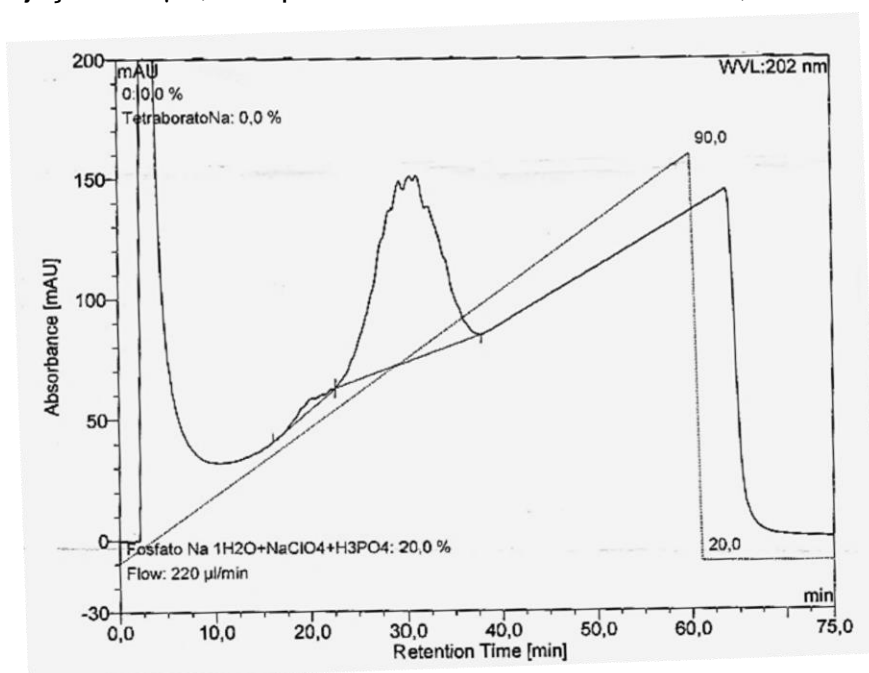
Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 33 - Cromatograma do padrão de heparina submetido a dessalinização pelo protocolo do ultra-filtro de Microcon(R) lavado uma vez. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



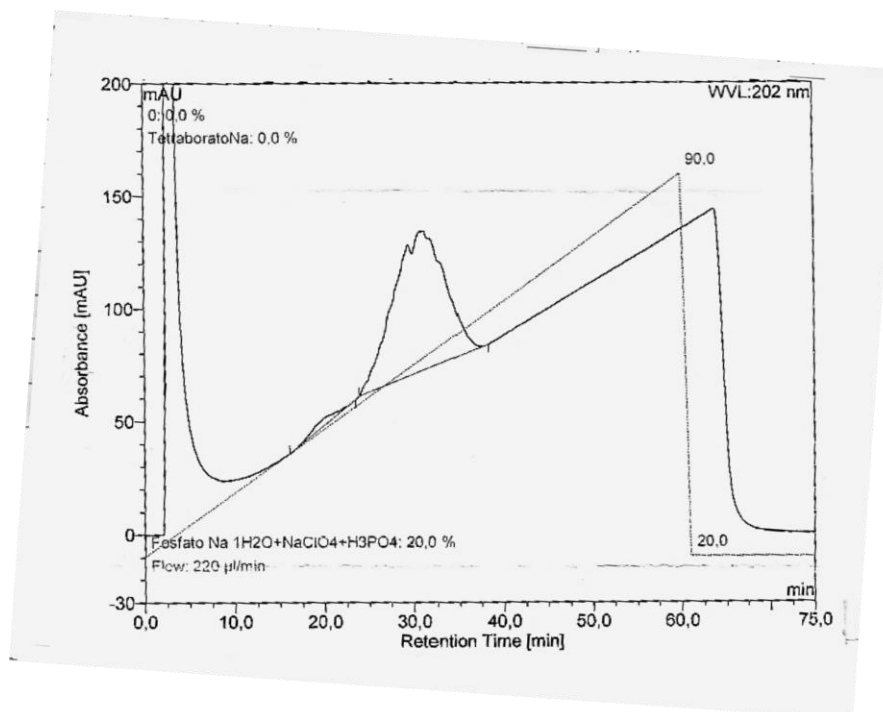
Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 34 - Cromatograma da amostra 4 submetida a dessalinização pelo protocolo do ultra-filtro de Microcon(R) lavada uma vez. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



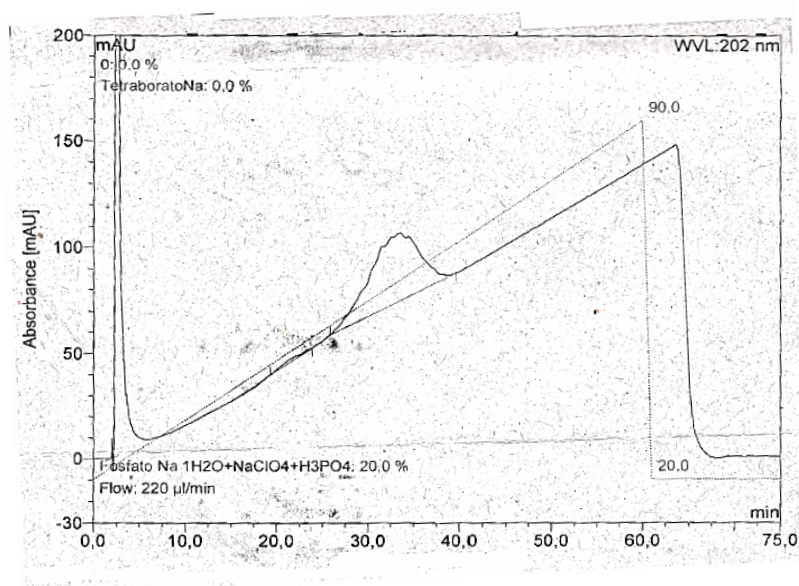
Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 35 - Cromatograma da amostra 4 submetida a dessalinização pelo protocolo do ultra-filtro de Microcon(R) lavada duas vezes. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 36 - Cromatograma da amostra 4 submetida a dessalinização pelo protocolo do ultra-filtro de Microcon(R) lavada cinco vezes, Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.

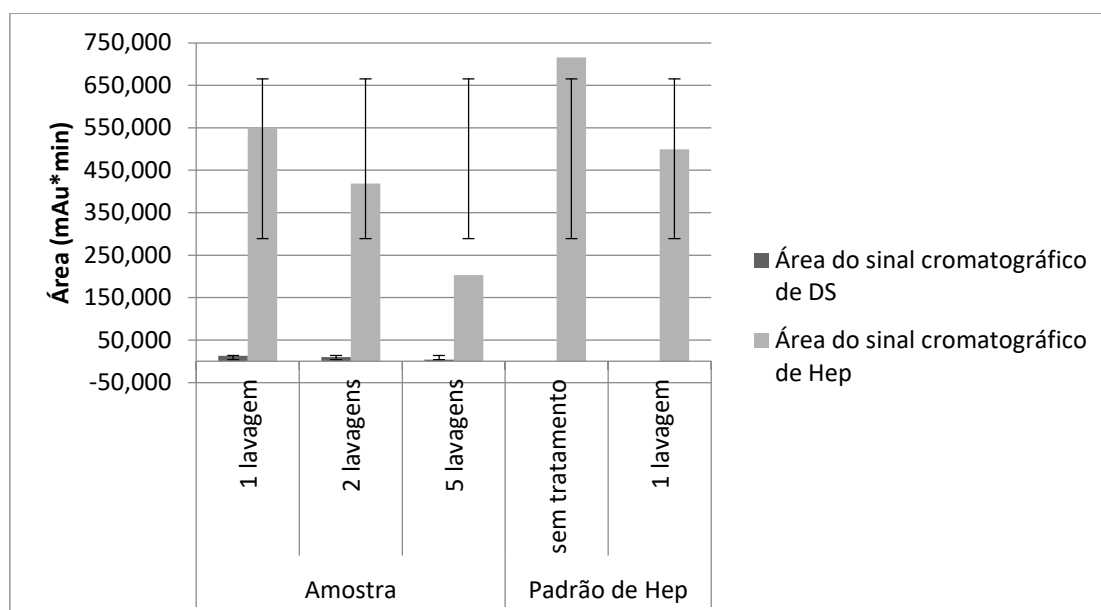


Fonte: (DO AUTOR, 2018).

A figura 37 evidencia o gráfico referente à área do sinal cromatográfico de DS e heparina na amostra 4, além do sinal do padrão de heparina sódica sem tratamento e submetida a apenas uma lavagem, e fica claro que a perda de massa é diretamente proporcional a quantidade de etapas de lavagem que a amostra é submetida, o sinal de DS que é pequeno na amostra, fica quase imperceptível no estudo com cinco lavagens.

Enquanto que o padrão possui uma redução de 67% da área quando submetido a uma lavagem, não julgamos necessário desenvolver a análise do padrão com duas e cinco lavagens, pois já havíamos constatado a falha neste protocolo, assim sendo, preservamos o padrão escasso.

Figura 37 - Gráfico do estudo das etapas de lavagem da Amostra 4 com o ultra filtro de Microcon®.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

A especificação do Microcon® está relacionada com o parâmetro de massa molar de corte (MMCO), ou seja, a capacidade da membrana em reter moléculas de uma massa molar acima do especificado. O fabricante recomenda o uso de uma membrana com massa molar de corte pelo menos duas vezes inferior a massa molar do analito analisado (MERCK MILIPORE, 2013).

Sendo os analitos da mesma classe dos glicosaminoglicanos, suas massas molares variam entre 12 a 15 kDa, por outro lado, o ultra-filtro de Microcon® utilizado possui MMCO na faixa de 10 kDa. Estes dados justificam a retenção parcial da amostra após sucessivas lavagens devido a proximidade entre as massas molares e a faixa de separação do ultra-filtro (MERCK MILIPORE, 2013).

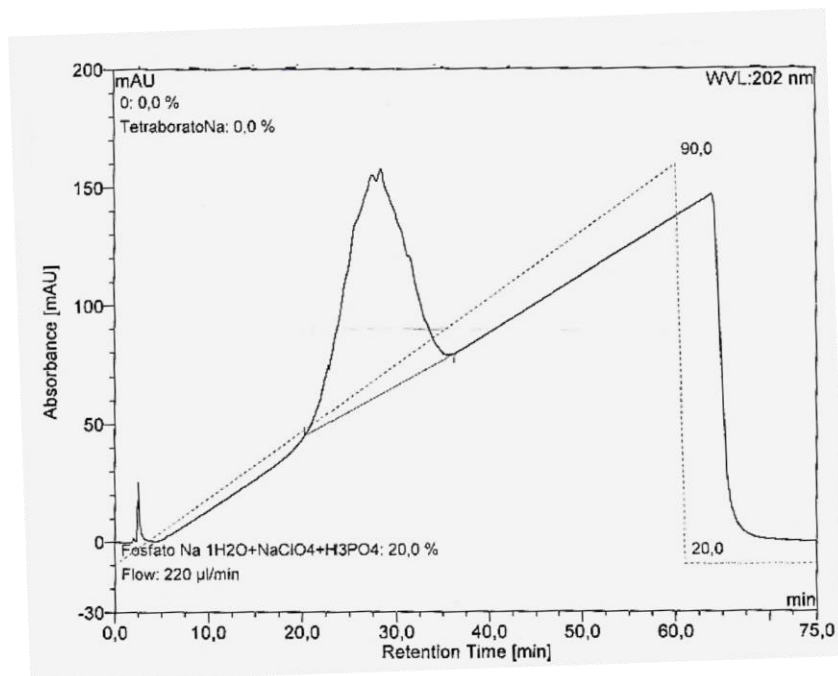
A perda de massa retira a credibilidade do método utilizando o Microcon® por si só, além disso, a adição de água para lavagem da amostra acaba promovendo diluições não controladas, as quais prejudicam os cálculos acerca da concentração final injetada no cromatógrafo.

4.1.1.3 Protocolo de preparo de amostra com a coluna Micro Bio Spin®

No caso da coluna Micro Bio Spin®, a separação das espécies ocorre pelo fenômeno de exclusão molecular, com limite de exclusão na ordem de 6 kDa, ou seja, moléculas inferiores a esta massa molar ficam retidas nos poros de poliacrilamida da coluna, enquanto as moléculas maiores não interagem ou interagem pouco com a coluna, sendo eluídas primeiro (BIO RAD, 2000).

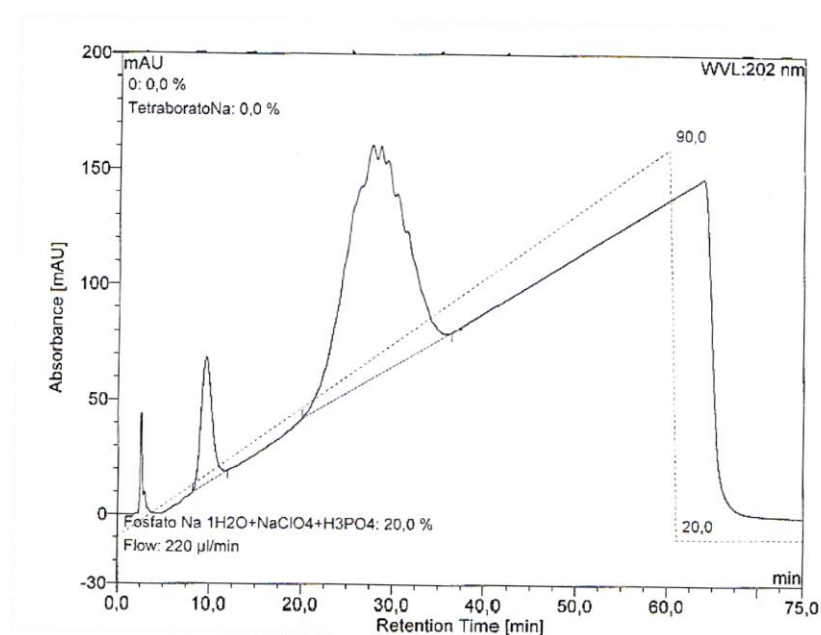
O procedimento com a coluna Micro Bio Spin® foi avaliado utilizando o padrão de heparina sódica sem tratamento (Figura 38), com tratamento de dessalinização (Figura 39) e a amostra 4 dessalinizada (Figura40).

Figura 38 - Cromatograma do padrão de heparina sem tratamento. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



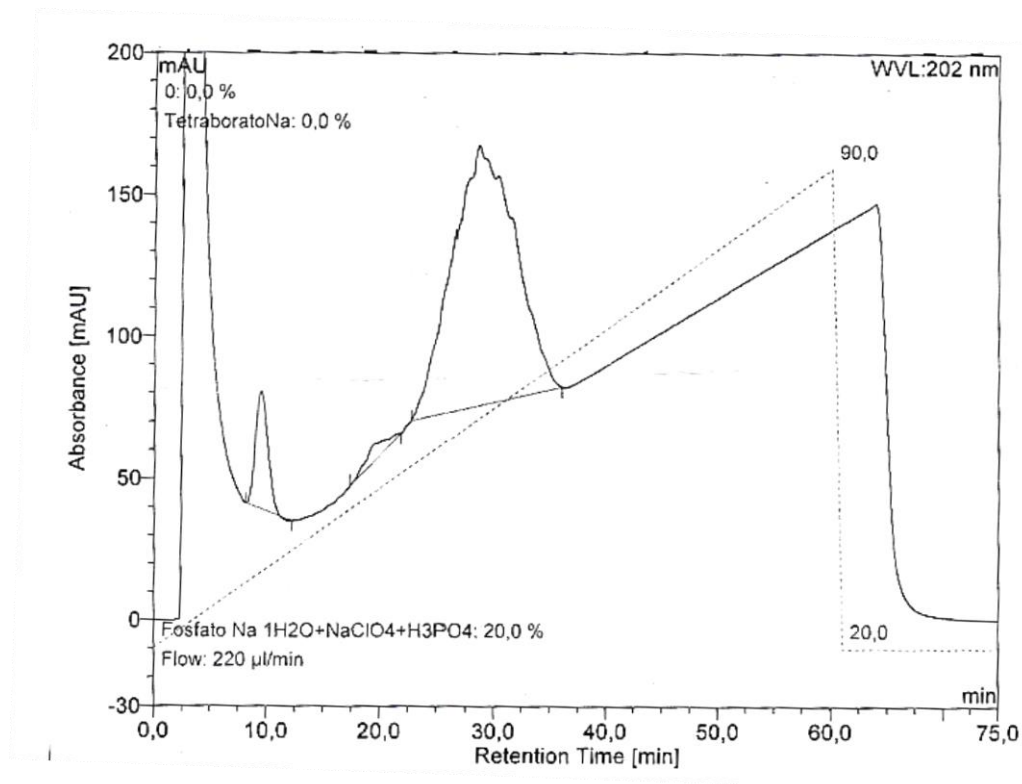
Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 39 - Cromatograma do padrão de heparina submetido a dessalinização pelo protocolo da coluna Micro Bio Spin®. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

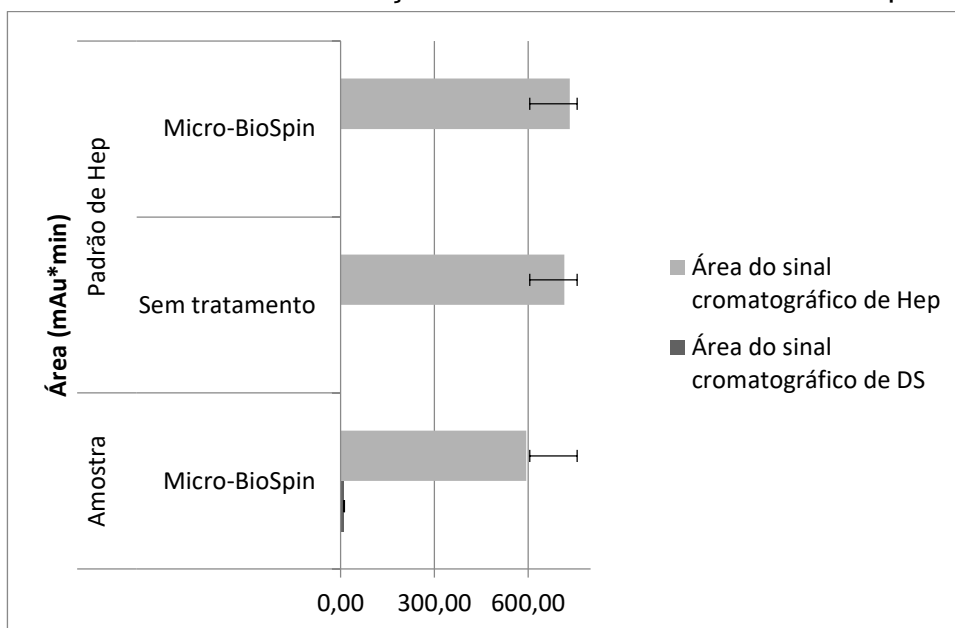
Figura 40 - Cromatograma da amostra 4 submetida a dessalinização pelo protocolo da coluna Micro Bio Spin®. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Padrão sob as duas condições e amostra foram injetados duas vezes cada e a média das áreas dos sinais cromatográficos são mostrados no gráfico da Figura 41.

Figura 41 - Gráfico da área do sinais cromatográficos de Hep no padrão e na amostra no estudo da dessalinização utilizando a coluna Micro Bio Spin®.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

A fim de avaliar estatisticamente os resultados recorreremos ao manual de orientações do INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (2010), pois a BRASIL (2017) apenas informa que deve ser usado um nível de significância de 0,05% em testes estatísticos.

Os testes de Snedecor e Student foram utilizados para avaliar equivalência entre os sinais do padrão sem e com tratamento e entre os sinais do padrão sem tratamento e amostra 4 dessalinizada pela coluna Micro Bio Spin®. Os cálculos mostrados no APÊNDICE A mostram que existe equivalência entre os padrões, em contrapartida não há equivalência entre as áreas de amostra e padrão sem tratamento ($\alpha=0,05\%$).

A falta de equivalência pode estar atribuída à conversão teórica entre potência biológica e massa empregada neste método e baseado na Farmacopeia americana (THE UNITED, 2012).

Para evitar a imprecisão nos cálculos de concentração foi adotada a secagem e a pesagem da amostra após o processo de dessalinização. Portanto, a amostra foi inserida no aparelho Speed Vac, secada a partir do processo de centrifugação sob vácuo à temperatura ambiente, e pesada.

Observa-se que 100 μL de amostras a 5000 UI/mL equivalem, em média 1,57 ($\pm 0,04$) mg de heparina seca, enquanto que 100 μL de amostras 5000 UI/0,25 mL, em média, são iguais a 2,62 ($\pm 0,23$) mg de heparina seca.

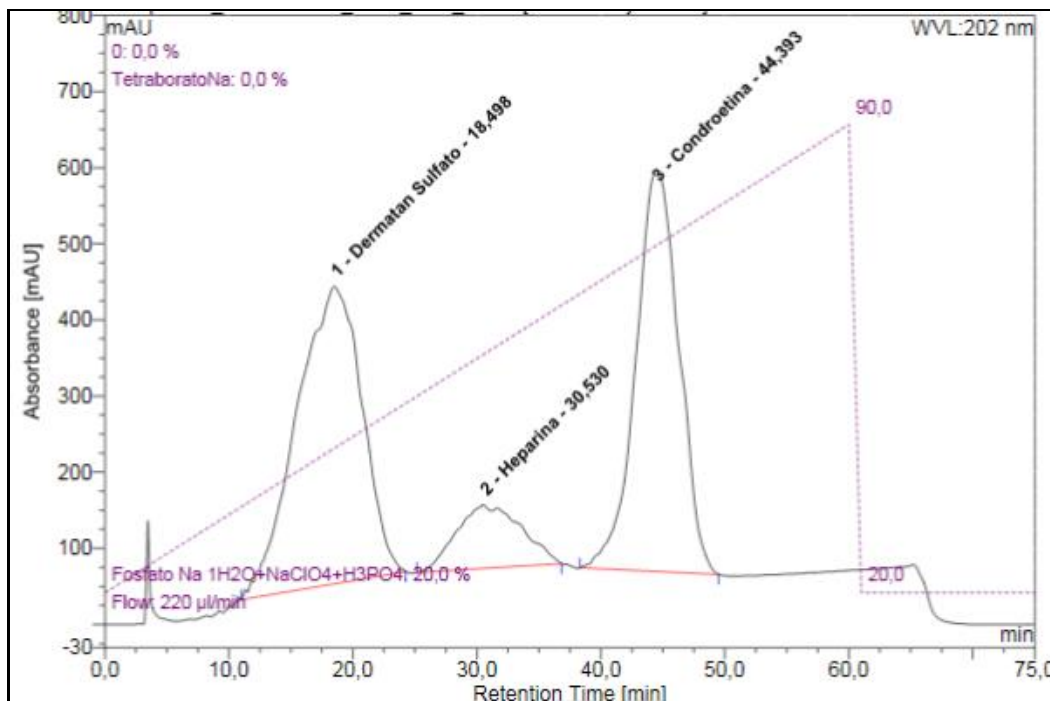
Esses valores são importantes porque não refletem a proporcionalidade das concentrações em potência biológica/mg contidas na Farmacopeia americana (THE UNITED, 2012), sendo necessário avaliar a massa experimental para que as concentrações das soluções preparadas estejam corretas.

O sucesso neste último procedimento pode estar associado à ausência de etapas de lavagens com água deionizada e ao limite da exclusão molecular inferior às massas molares dos GAGs, fazendo com que estes sejam eluídos rapidamente pela pouca interação com a fase estacionária, enquanto que moléculas menores, como dos excipientes, fiquem retidas nos poros da resina.

4.1.2 Resultados da adequação do Sistema Analítico

A adequação do sistema é mostrada no cromatograma da figura 42, obtido por meio de injeções da solução contendo DS, Hep e OSCS nas concentrações de 20, 10 e 10 mg/mL, respectivamente. Fica claro que a Hep possui menor absorvidade que DS e OSCS, e essa diferença é mais pronunciada em comprimentos de ondas menores. Provavelmente devido a essas imposições, este método ser adequado somente para a identificação (TREHY, 2009).

Figura 42 - Cromatograma da solução de adequação do sistema contendo 10 mg/mL de padrão USP de DS, 20 mg/mL de padrão USP de Hep e 10 mg/mL de padrão USP de OSCS. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

A Tabela 9 mostra os resultados de adequação do sistema ao ensaio proposto. A ordem de eluição e o tempo de retenção (Tr) ficaram próximos ao preconizado na Farmacopeia americana (THE UNITED, 2012), bem como o desvio padrão relativo (DPR%) permaneceu na faixa aceitável de no máximo 2%.

Tabela 9 - Resultados de tempo de retenção do ensaio de adequação do sistema para as substâncias DS, Hep e OSCS.

Injeção	DS	Heparina	OSCS
	Tempo de retenção (min)	Tempo de retenção (min)	Tempo de retenção (min)
1	18,35	30,46	44,29
2	18,50	30,53	44,39
3	18,15	30,31	44,00
4	18,43	30,54	44,23
5	18,53	30,62	44,63
6	19,09	30,42	44,37
Média	18,51	30,48	44,32
Desvio padrão	0,32	0,11	0,21
Desvio padrão relativo (%)	1,71	0,35	0,47

Fonte: (DO AUTOR, 2018).

A oscilação no tempo de retenção é um problema comum deste método, alguns estudos padronizam o tempo de retenção relativo como parâmetro de identificação por causa deste agravo. Sabe-se que estas alterações podem ser atribuídas ao uso de tampões salinos, os quais promovem a diminuição da vida útil das colunas cromatográficas (TREHY, 2009).

A tabela 10 mostra os resultados de resolução das seis injeções da solução de adequação do sistema, e o parâmetro foi atendido em todas as replicatas. Pode ser reparado que os sinais de DS e Hep são bastante próximos, a concentração de 20 mg/mL de Hep promove um decréscimo no tempo de retenção se comparada com uma solução de 5 mg/mL de Hep, promovendo esta resolução pequena, entretanto, a pouca absorvidade de heparina a 202 nm impede a diminuição da concentração (CHMIELEWSKI, 2011)

Tabela 10 - Resultados de resolução das seis injeções da solução de adequação do sistema.

Injeção	Resolução	
	DS/Hep	Hep/OSCS
1	1,15	1,61
2	1,17	1,65
3	1,14	1,58
4	1,15	1,65
5	1,13	1,62
6	1,07	1,63

Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Entretanto, os resultados a respeito da resolução estão dentro do critério de aceitação preconizado na Farmacopeia Americana (THE UNITED, 2012), os quais são resolução superior a 1,0 entre DS e heparina e 1,5 entre heparina e OSCS.

Os resultados satisfatórios para a adequação do sistema são considerações de suma importância para dar prosseguimento a uma validação do método confiável.

4.1.3 Resultados da validação do Método Analítico pelo parâmetro de seletividade

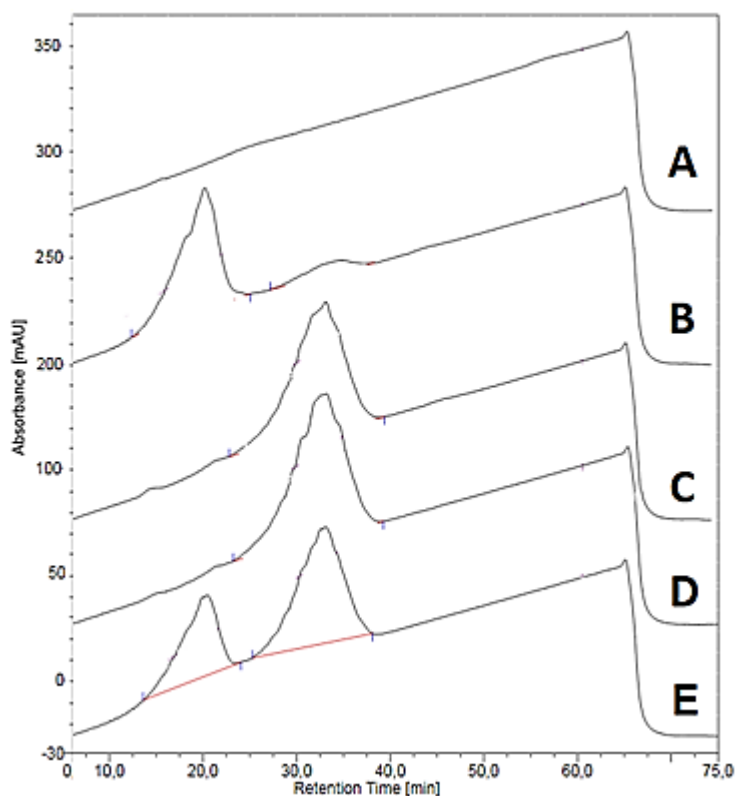
O ensaio foi realizado com o DS devido à sua semelhança estrutural com Hep cuja interferência na identificação dos analito é um fator complicante no método analítico.

O perfil cromatográfico da amostra de heparina sem adição padrão foi comparada ao padrão de DS+Hep e a amostra com adição padrão de Hep e com adição padrão de DS. As concentrações de padrão adicionadas na amostra foram as mais diluídas possíveis acima do LD para comprometer a detecção.

A Figura 43 mostra os cromatogramas usados para avaliação da seletividade. Pode-se observar que a solução branco (Figura 43-A) não apresentou pico na região do tempo de retenção das substâncias investigadas; em relação a solução padrão (Figura 43-B) a absorvidade de Hep decresce em maiores concentrações de DS. Nas Figuras 43-C/D observa-se aumento do sinal de Hep quando comparadas as amostras sem adição e com adição de padrão de Hep, e por último, na amostra com

adição de padrão de DS (Figura 43-E) é possível detectar o sinal de DS e de Hep com os tempos de retenção em torno de 20 min para DS e 30 min para Hep.

Figura 43 - Cromatogramas dos resultados para o parâmetro seletividade, onde (A) Branco; (B) Padrão; (C) Amostra 20 mg/mL, sem adição padrão; (D) Amostra 20 mg/mL com adição de padrão de heparina 2,5 mg/mL; (E) Amostra 20 mg/mL com adição de padrão de DS 1,25 mg/mL. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 μ L, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

A tabela 11 resume os resultados de tempo de retenção para os sinais de DS e Hep, pode ser notada, novamente, a grande oscilação entre os tempos de retenção do sinal de Hep, enquanto que o sinal de DS se mantém praticamente estável, eluindo em 20 min.

A grande assimetria do pico de Hep aliada a oscilação esperada nas colunas de troca iônica podem ser as causas principais para essa variação encontrada. Em todas as vertentes estudadas, apenas os dois sinais nesta região, que compreende entre 15-35 min, são encontrados.

Tabela 11 - Resultados do ensaio de seletividade.

Soluções	Dermatan Sulfato		Heparina	
	Tempo de retenção (min)	Média	Tempo de retenção (min)	Média
Padrão de heparina 20 mg/mL e de DS 10 mg/mL	20,16	20,12	27,21	27,98
	20,16		28,51	
	20,05		28,23	
Amostra 20 mg/mL Sem adição padrão	Não se aplica		33,11	33,21
			33,2	
			33,31	
Amostra 20 mg/mL com adição de padrão de heparina 2,5 mg/mL	Não se aplica		33,18	32,92
			32,42	
			33,16	
Amostra 20 mg/mL com adição de padrão de DS 1,25 mg/mL	20,51	20,33	33,07	32,93
	20,28		33,05	
	20,19		32,66	

Fonte: (DO AUTOR, 2018).

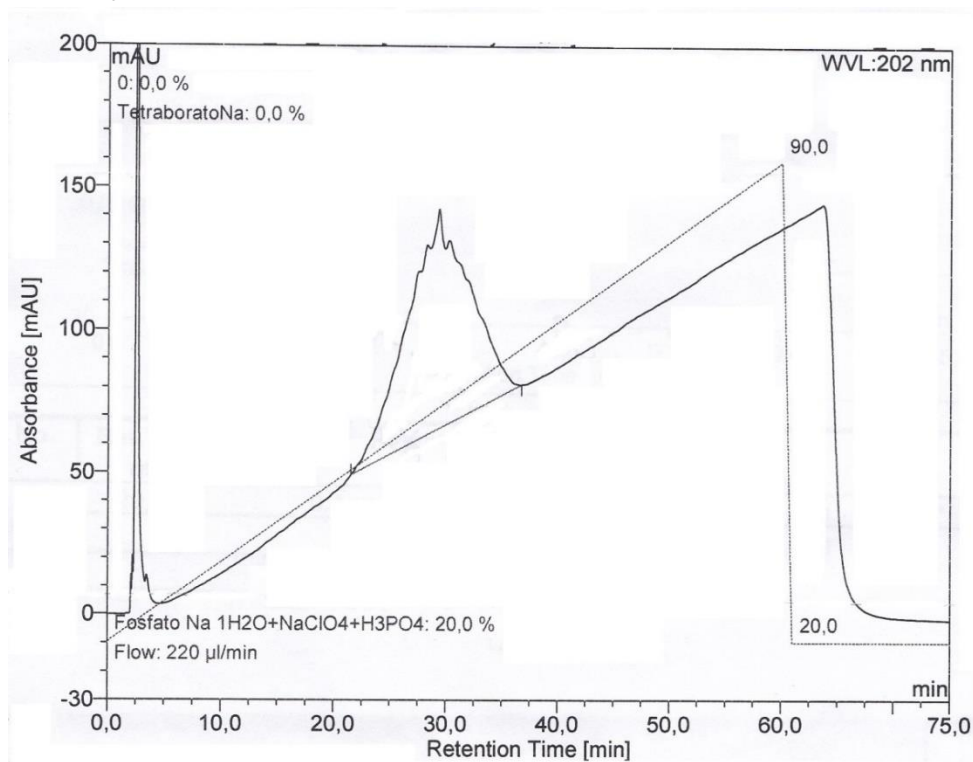
Segundo a resolução de suporte, o critério de aceitação é a capacidade do método em obter resultado positivo para amostra contendo o analito e resultado negativo para outras substâncias presentes na amostra. Sendo assim, de acordo com as evidências encontradas podemos concluir que este método é seletivo.

4.1.4 Resultados das análises das amostras do produto acabado heparina sódica suína

Os cromatogramas das amostras analisadas estão apresentados nas figuras 44-50, onde foi possível detectar o sinal cromatográfico no tempo de 2 min com bastante intensidade. O sinal cromatográfico referente à heparina, considerando injeções distintas, apresenta uma variação do tempo de retenção entre 29 a 31 min.

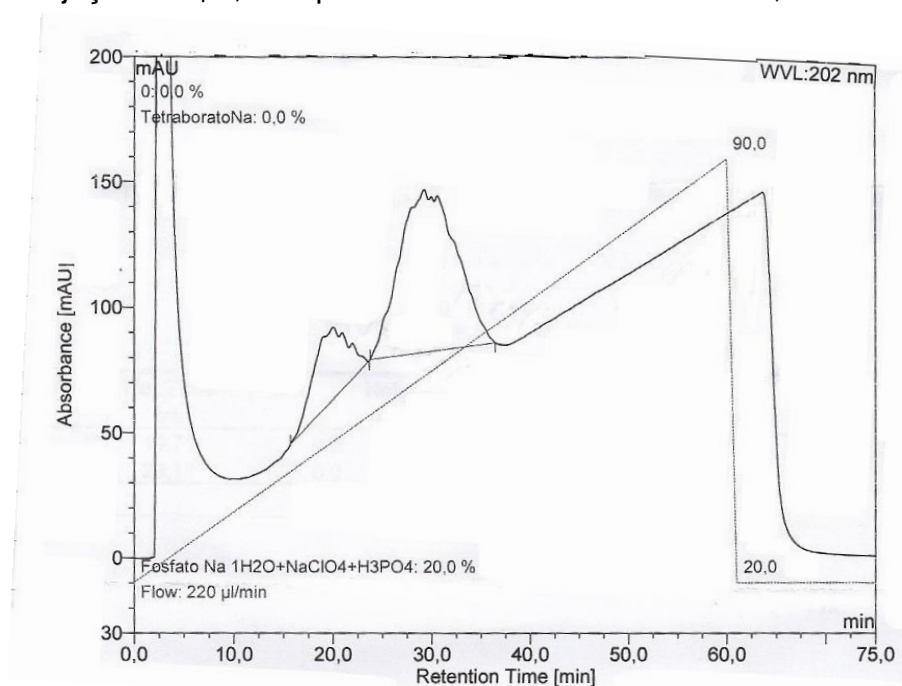
Este comportamento é aparentemente frequente em ânions hidrofílicos e, provavelmente está relacionado com a saturação da fase estacionária com o tampão salino contido na fase móvel, o qual pode provocar alterações no tempo de eluição, bem como, o perfil peculiar extremamente assimétrico da Hep pode promover variações inevitáveis na determinação do tempo de retenção (THERMO SCIENTIFIC, 2009; TREHY, 2009).

Figura 44 - Cromatograma da Amostra 1. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



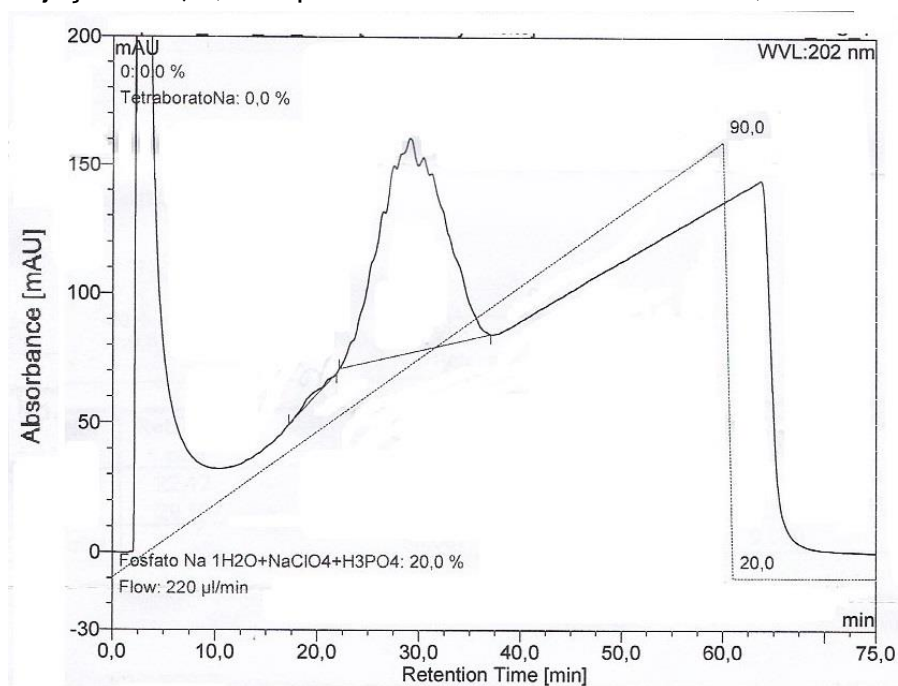
Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 45 - Cromatograma da Amostra 2. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 μ L, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



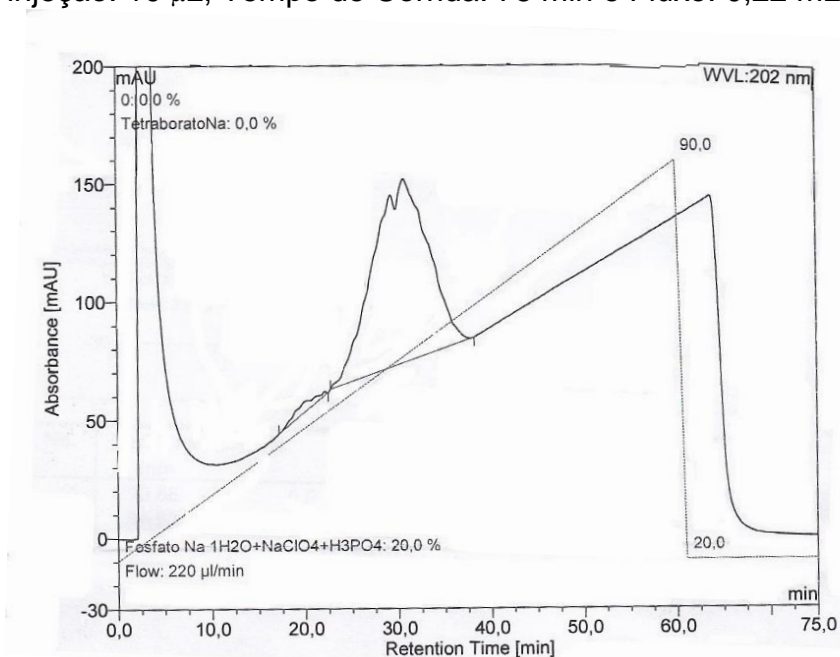
Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 46 - Cromatograma da Amostra 3. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 μ L, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



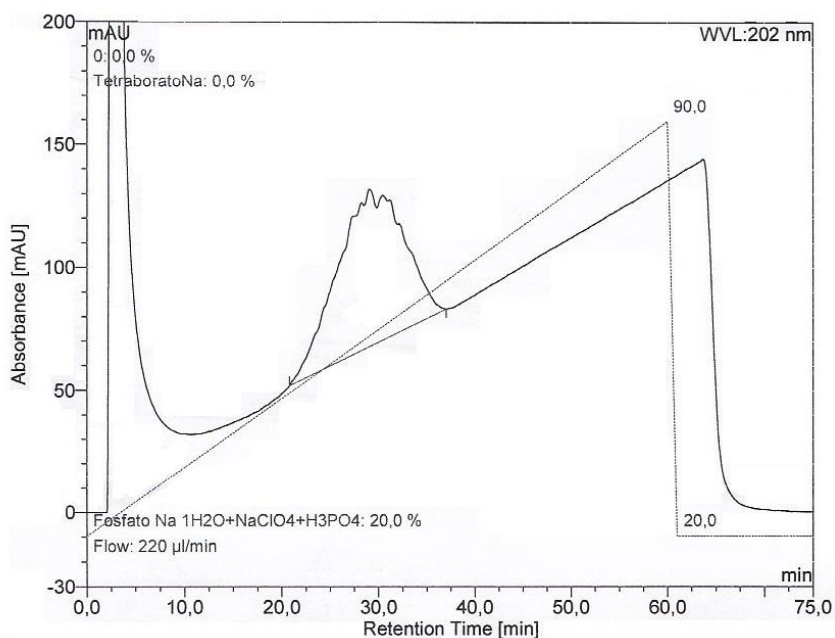
Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 47 - Cromatograma da Amostra 4. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



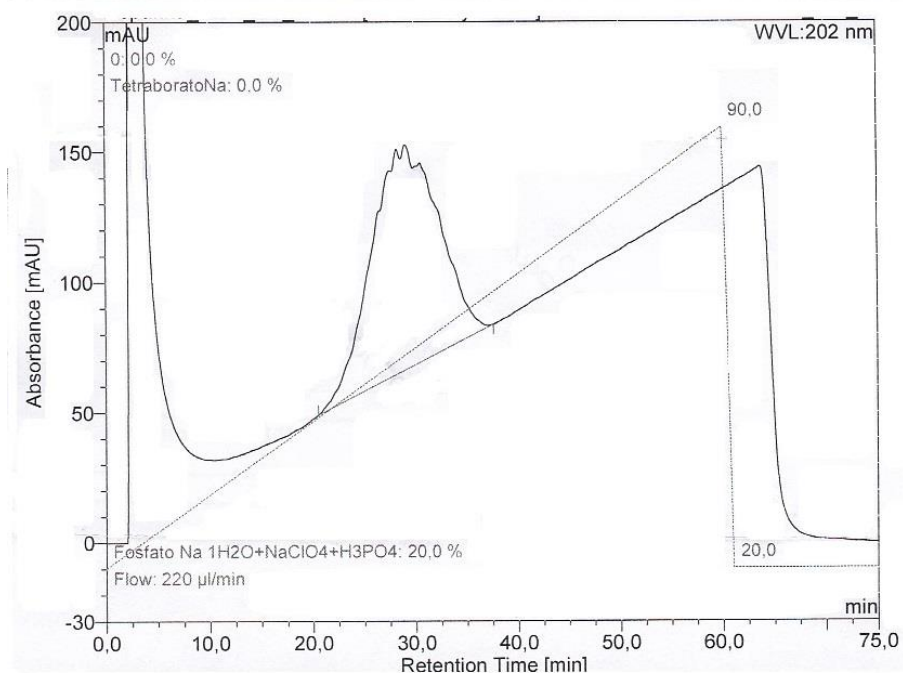
Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 48 - Cromatograma da amostra 5. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



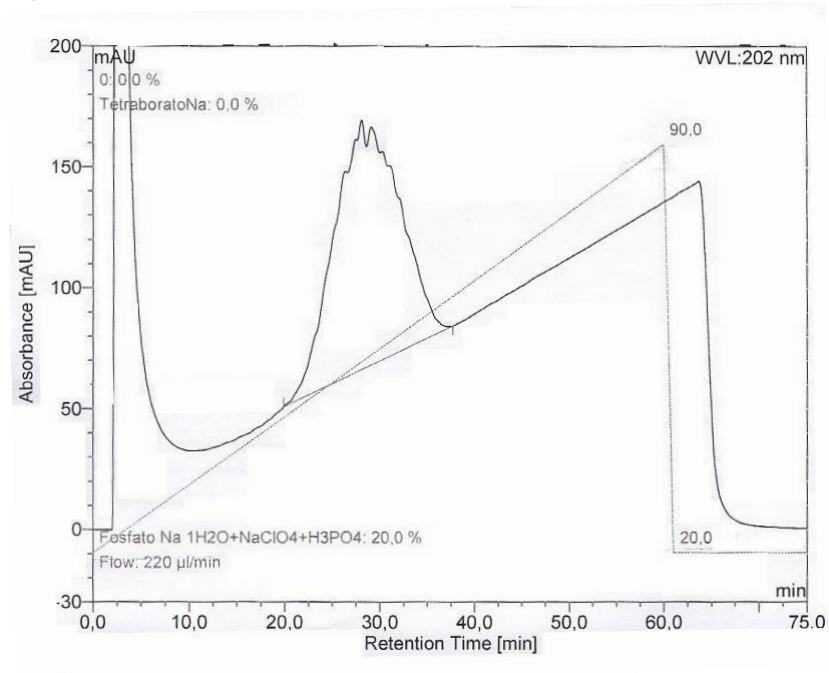
Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 49 - Cromatograma da amostra 6. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 50 - Cromatograma da amostra 7. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detector de arranjo de fotodiodos, Temperatura do Forno: 40°C, Volume de injeção: 10 µL, Tempo de Corrida: 75 min e Fluxo: 0,22 mL/min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Foi possível detectar nas amostras 2,3 e 4 (Figuras 45,46,47; respectivamente) a presença de DS com variação de 19 a 20 min em seu tempo de retenção. Considerada uma impureza, o teor máximo de DS que pode ser encontrado em formulações de heparina sódica é de 1%.

Embora não seja apropriado para análises quantitativas, a abordagem qualitativa como um método de triagem permite avaliar a presença de DS e OSCS nas formulações, para posterior quantificação relativa.

4.2 Método para identificação de heparina, dermatan sulfato e condroetina supersulfatada em formulações de heparina sódica suína a partir da ressonância magnética nuclear H^1 .

A análise por RMN H^1 contribuiu para a verificação da eficiência do método cromatográfico de identificação, já que é uma técnica mais sensível. A faixa que compreende 2,00 e 2,20 ppm é onde podem ser detectados os sinais dos prótons da metila do grupamento N-acetil de Hep, DS e OSCS (BEYER, 2008).

Como já abordado anteriormente, a Hep é composta de fragmentos heterogêneos que possuem uma variedade de substituições possíveis, dentre elas, a porção Glicosamina, cuja substituição pode ser GlcNAc ou GlcNS, e suas variações. O sinal de deslocamento em torno de 2,03 ppm está associado a GlcNAc, espécie menos sulfatada do que GlcNS.

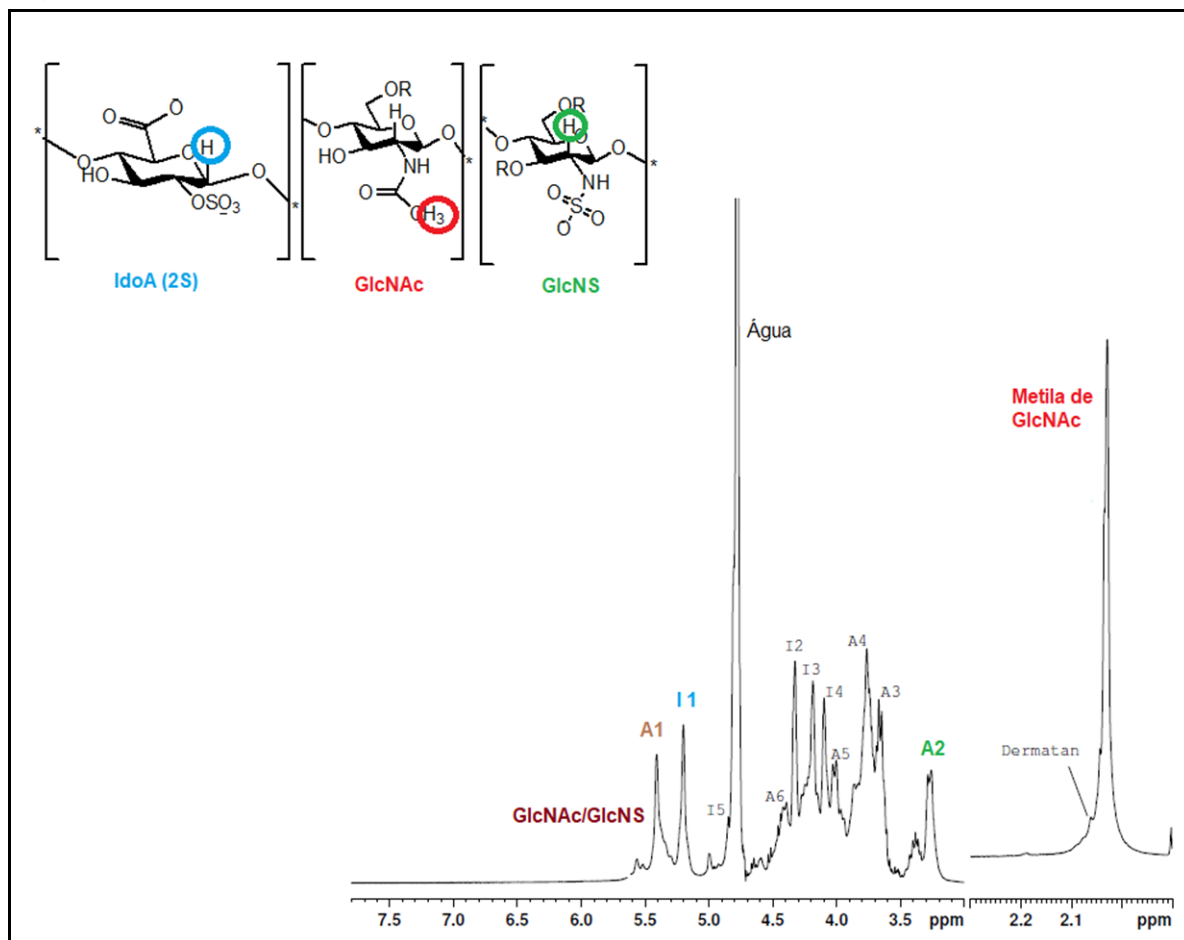
Conforme mostrado nos espectros de padrão USP de Hep, de DS e de OSCS nas figuras 51,52 e 53, os sinais de deslocamento característicos são 2,03; 2,06; 2,11 ppm, respectivamente.

Esses resultados corroboram com a literatura relacionada, apontando que a metila na Hep está mais blindada que em DS, cuja blindagem é mais efetiva do que em OSCS. Este fato pode estar relacionado com a posição do grupo sulfato em relação à metila, pois no caso da Hep, a substituição GlcNAc, que não possui grupo sulfato e a substituição GlcNAc (6S), cujo grupo sulfato está no carbono 6 conferem maior blindagem aos hidrogênios do grupo acetil (BEYER, 2008).

Nas espécies acetiladas de DS, o grupo sulfato é encontrado no carbono 4 da galactosamina, diminuindo a blindagem dos hidrogênios do grupamento acetil. Já na

adulteração OSCS, com grupos sulfatos no carbono 2,3 do IdoA e 4,6 da galactosamina, provocam uma menor blindagem possibilitando encontrar os sinais dos prótons mais a esquerda do espectro.

Figura 51 - Espectro de RMN do padrão USP de Heparina.



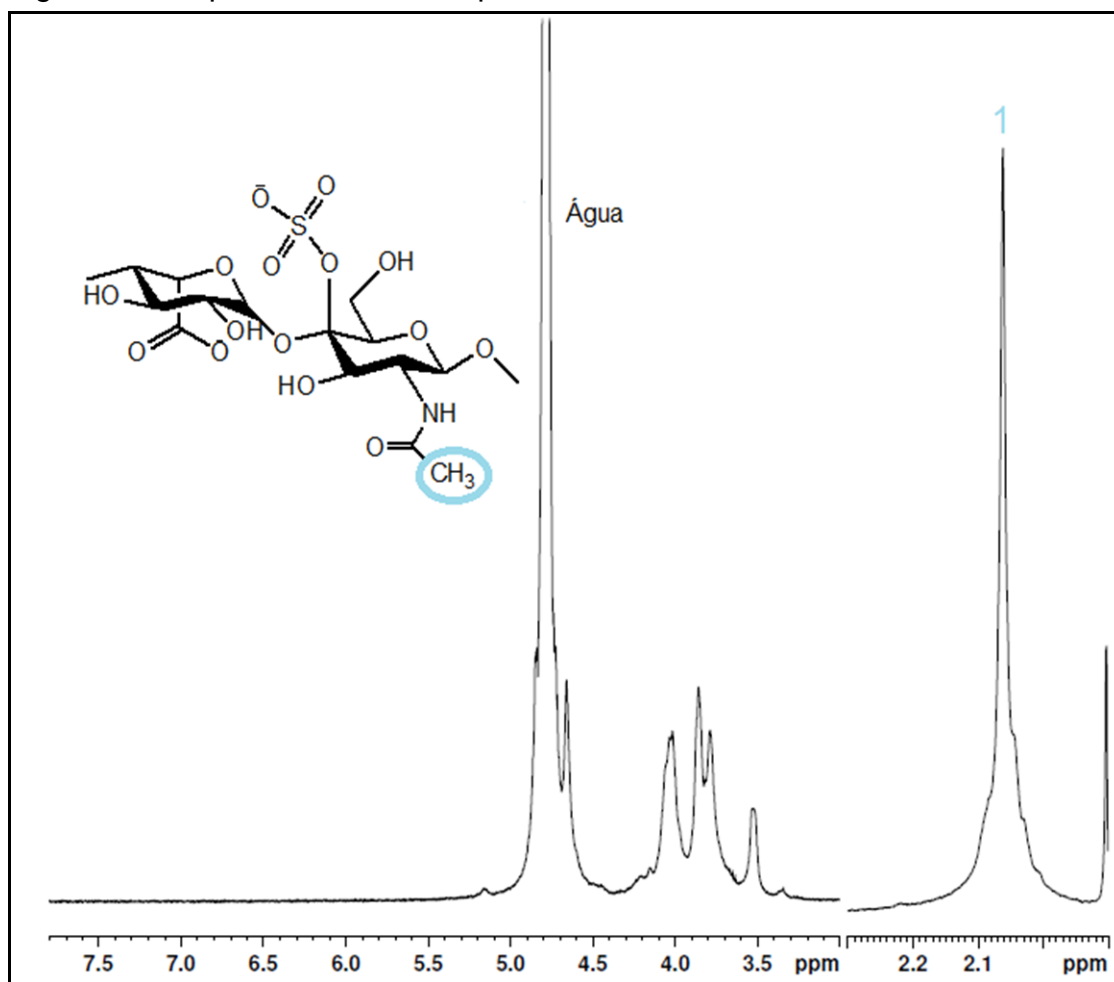
Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Além do sinal em 2,03 ppm, outros sinais de deslocamento são característicos de Hep, como em 3,28 ppm do próton de GlcNS ou GlcNS (6S), sinalizado como A2; em 5,21ppm referente ao próton de IdoA (2S), indicado como I 1 e; a proporção GlcNAC/GlcNS em 5,42 ppm, denominada no espectro da Figura 51 como A1.

Pode ser observado que o próprio padrão de Hep apresenta sinal de DS em 2,06 ppm confirmando a dificuldade em purificar o analito com potencial anticoagulante, os demais sinais são referentes aos prótons dos resíduos de IdoA (I) e de glicosamina (A) encontrados na estrutura da heparina (AQUINO, 2010b).

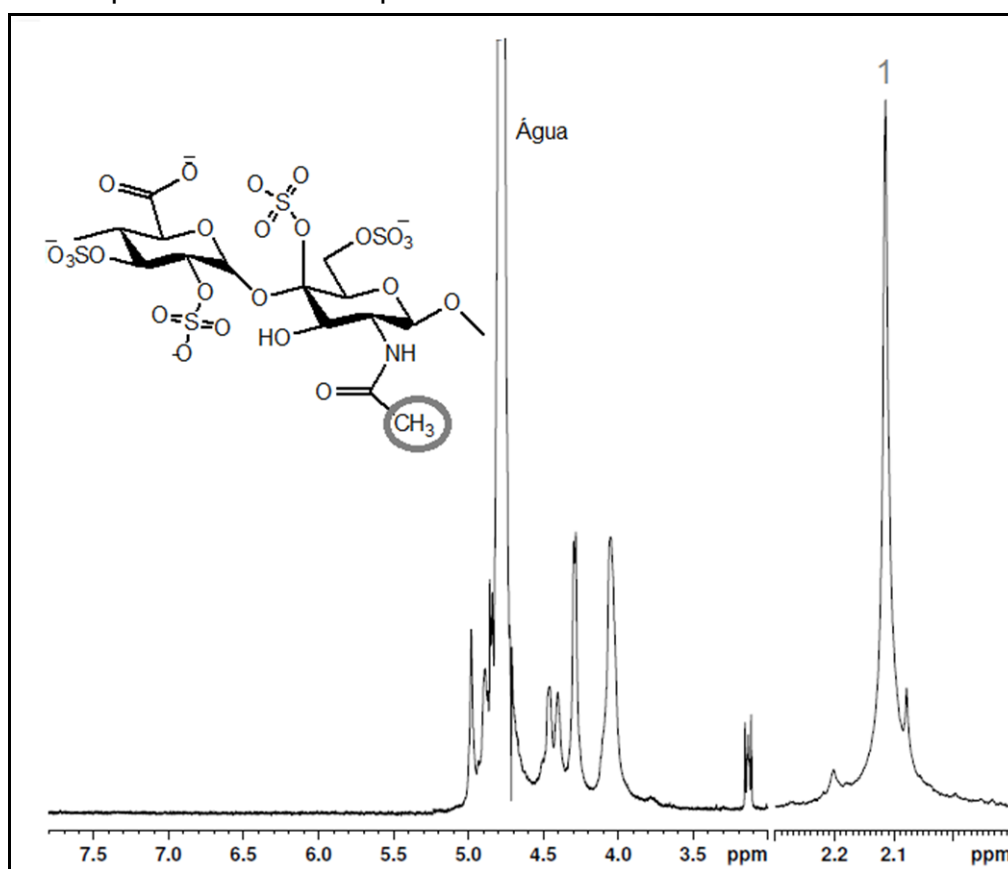
Em todos os espectros (Figura 51,52 e 53) foi possível detectar o sinal de deslocamento do solvente água em aproximadamente 4,75 ppm, corroborando com MONAKHOVA & DIEHL (2015).

Figura 52 - Espectro de RMN do padrão USP de DS.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Figura 53 - Espectro de RMN do padrão USP de OSCS.

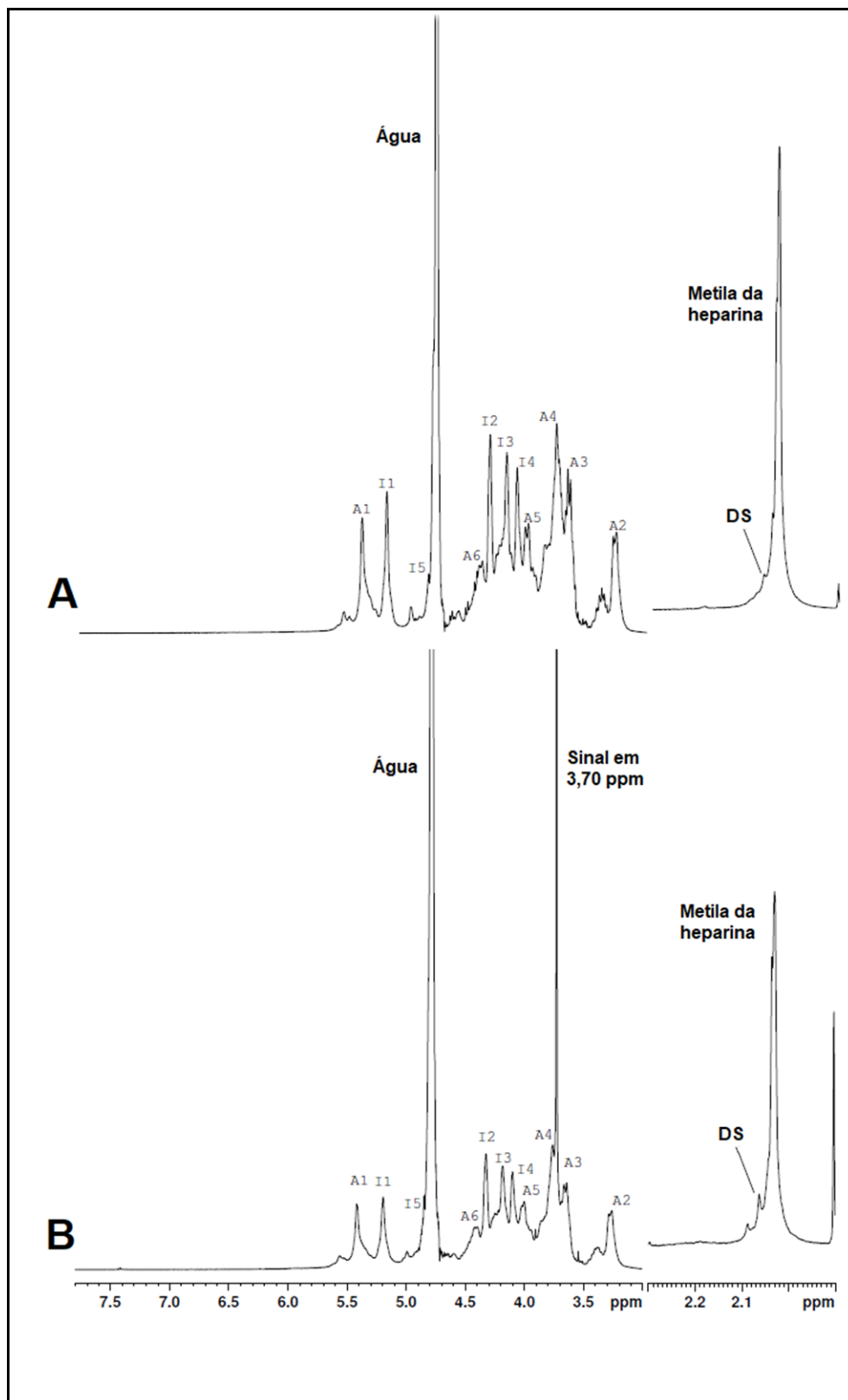


Fonte: (DO AUTOR, 2018).

4.2.1 Resultados das análises das amostras do produto acabado heparina sódica suína

Em todas as amostras nota-se sinais de deslocamento característicos de Hep, de DS em 2,06 ppm, bem como, um sinal inesperado em 3,70 ppm. A Figura 54, ilustra a amostra 2, cujo sinal de DS foi o mais pronunciado.

Figura 54 - Espectros do padrão de Hep (A) e da amostra 2 (B) com uma janela espectral de 0 a 7,50 ppm.

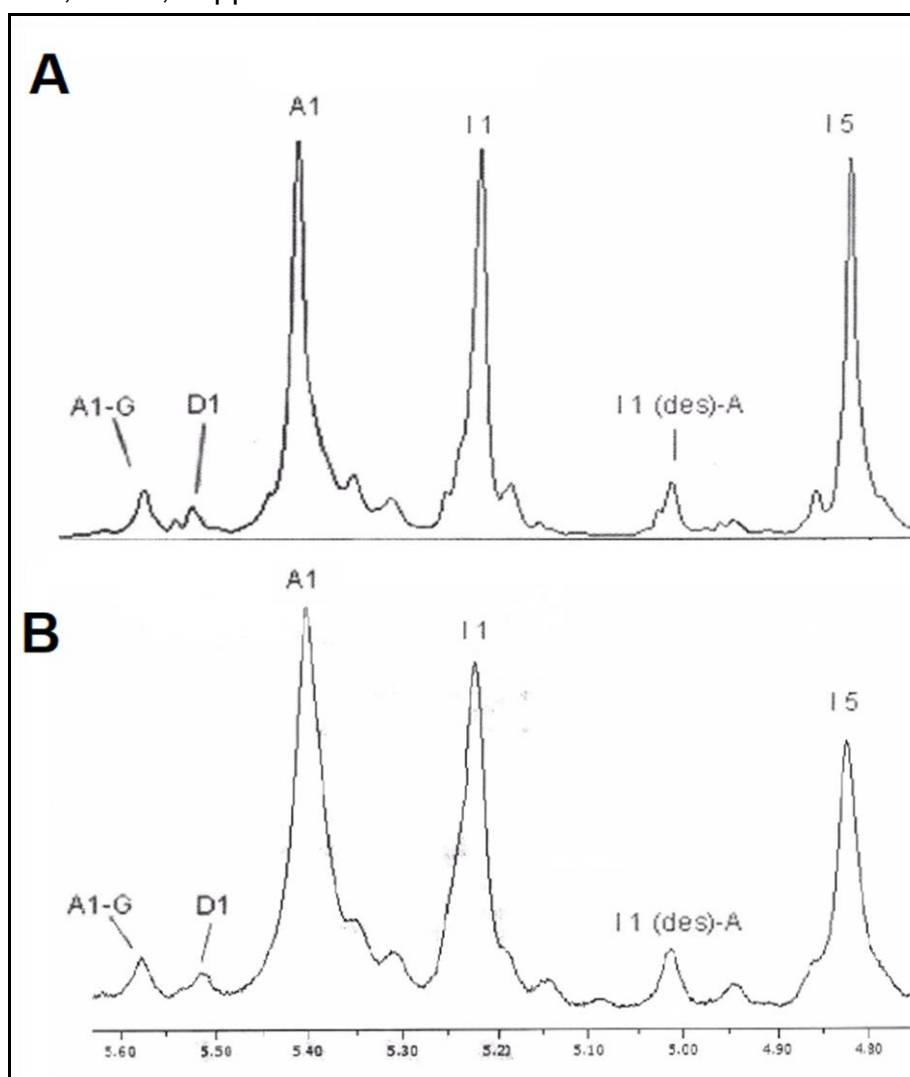


Fonte: (DO AUTOR, 2018).

A região do espectro entre 4,7 e 5,7 compreende sinais minoritários atribuídos a resíduos importantes para a atividade anticoagulante da Hep, como por exemplo, o próton anomérico das espécies GlcNS (6S) ligadas a GlcA em 5,57 ppm (A1-G); o próton do monômero GlcNS (3,6S) em 5,52 ppm (D1); e por último em 5,02 ppm está relacionado com o próton H1 das unidades de IdoA não sulfatadas [I 1 (des)-A] (AQUINO, 2010b).

A figura 55 compara esta região do espectro do padrão de Hep e da amostra 2 e há uma grande semelhança entre o perfil espectral, assim como, para as demais amostras.

Figura 55 - Espectro de padrão de Hep (A) e amostra 2 (B) com uma janela espectral de 4,90 a 5,60 ppm.



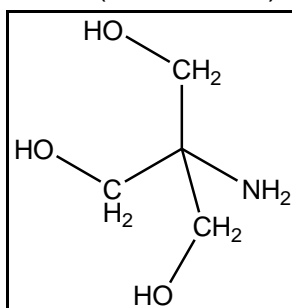
Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Os resultados de RMN H^1 para todas as amostras analisadas foram semelhantes e são resumidos na tabela 12. A presença da impureza DS é verificada nas amostras 1 a 7, no entanto, apenas as amostras 2, 3 e 4 foram detectadas pelo método de identificação, sugerindo que a concentração de DS nas amostras 1,5,6 e 7 sejam inferiores ao LD do método cromatográfico.

A fração em 3,70 ppm pode ser vista também no branco composto de água deionizada, o qual foi submetido ao processo de dessalinização semelhante às amostras. Esta região onde ele está localizado é característico de espécies orgânicas alifáticas oxigenadas, a área do sinal é diretamente proporcional ao número de hidrogênios que absorvem energia nesta radiofrequência (BIO RAD, 2000; SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2013; SANTOS & COLNAGO, 2013).

Todas as evidências encontradas convergem para a espécie Tris (hidroximetil)aminometano, ilustrado na figura 56. Esta substância é encontrada no tampão de acondicionamento da coluna Micro Bio Spin®.

Figura 56 - Estrutura molecular do Tris(hidroximetil)aminometano.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Portanto, esse sinal comprova que a etapa de remoção do tampão salino de acondicionamento visto no protocolo de dessalinização da coluna Micro Bio Spin® não é eficiente. Recomenda-se, então, rejeitar as duas primeiras eluições da amostra para evitar contaminação com vestígios do tampão, esta perda de amostra não vai prejudicar no desempenho da análise porque a etapa de dessalinização é anterior à etapa de secagem e pesagem, portanto, a massa restante será ajustada na proporção preconizada na farmacopeia.

Tabela 12 - Resultados de RMN encontrado para as amostras.

Amostras	Resultados RMN H¹
1	Presença dos sinais característicos de Hep: A1; A2; I 1; metila de GlcNAC; A1-G; D1 e [I 1 (des)-A] Presença de sinal de DS Ausência de sinal de OSCS Presença de sinal em 3,70 ppm.
2	Presença dos sinais característicos de Hep: A1; A2; I 1; metila de GlcNAC; A1-G; D1 e [I 1 (des)-A] Presença de sinal acentuado de DS Ausência de sinal de OSCS Presença de sinal em 3,70 ppm.
3	Presença dos sinais característicos de Hep: A1; A2; I 1; metila de GlcNAC; A1-G; D1 e [I 1 (des)-A] Presença de sinal de DS Ausência de sinal de OSCS Presença de sinal em 3,70 ppm.
4	Presença dos sinais característicos de Hep: A1; A2; I 1; metila de GlcNAC; A1-G; D1 e [I 1 (des)-A] Presença de sinal de DS Ausência de sinal de OSCS Presença de sinal em 3,70 ppm.
5	Presença dos sinais característicos de Hep: A1; A2; I 1; metila de GlcNAC; A1-G; D1 e [I 1 (des)-A] Presença de sinal de DS Ausência de sinal de OSCS Presença de sinal em 3,70 ppm.
6	Presença dos sinais característicos de Hep: A1; A2; I 1; metila de GlcNAC; A1-G; D1 e [I 1 (des)-A] Presença de sinal de DS Ausência de sinal de OSCS Presença de sinal em 3,70 ppm.
7	Presença dos sinais característicos de Hep: A1; A2; I 1; metila de GlcNAC; A1-G; D1 e [I 1 (des)-A] Presença de sinal de DS Ausência de sinal de OSCS Presença de sinal em 3,70 ppm.

Fonte: (DO AUTOR, 2018).

A adulteração OSCS não foi detectada em nenhuma das sete preparações corroborando com os resultados encontrados no método qualitativo. As conclusões encontradas no método de identificação e no método de RMN H¹ não se contradizem, confirmando a eficiência do método cromatográfico, cujo

implementação em ensaios de rotina é facilitada em detrimento das análises por ressonância magnética nuclear.

4.3 Método para a determinação do limite de galactosamina em hexosaminas totais presentes em formulações de heparina sódica suína .

Neste método, a amostra é submetida a uma hidrólise ácida que permite romper as ligações glicosídicas, convertendo o polissacarídeo em monossacarídeos redutores, a fim de que possam interagir com o detector amperométrico pulsado. Neste método apenas as hexosaminas são detectadas, pois o ácido urônico elui em torno de 28 min, tempo este que a corrida já foi cessada (RESTAINO, 2017).

Por isso espera-se encontrar apenas Glicosamina proveniente da estrutura da heparina, pois a galactosamina advém de impurezas como o dermatan sulfato e adulterantes como a condroitina supersulfatada.

A coluna cromatográfica de separação por troca iônica interagirá mais com a Glicosamina em comparação com a galactosamina devido a maior sulfatação da primeira hexosamina e de forma relativa consegue-se avaliar se galactosamina presente na amostra está dentro do limite estabelecido pela Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016g), a partir do sinal de glicosamina.

Uma vez separadas, as hexosaminas passam pela célula do detector amperométrico pulsado, onde ocorrem reações de oxi-redução e a partir de diferença de potencial empregado é possível identificar os sinais cromatográficos.

4.3.1 Método da Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016g) e método de ITOH (2013).

O método do trabalho de ITOH (2013) possui semelhanças com a Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016g) à respeito do preparo da amostra que em ambos os casos reportam-se à matéria-prima. A tabela 13 reúne as principais diferenças entre os métodos, que envolvem basicamente, a fase móvel e a coluna cromatográfica.

Tabela 13 - Principais diferenças entre os métodos de ensaio limite para matéria-prima de heparina sódica.

Método de heparina sódica		
Diferenças	Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016g)	ITOH (2013)
Coluna cromatográfica	Carbo Pac PA20 (comprimento: 3x150mm tamanho da partícula: 6 µm; diâmetro: 10 Å)	Carbo Pac PA1 (Comprimento: 4x250 mm; tamanho da partícula: 10 µm; diâmetro: 10 Å)
Fase de eluição	Hidróxido de Potássio 14 mM	Hidróxido de Sódio 8 mM
Etapa de limpeza	Hidróxido de Potássio 100 mM	60% de 8mM de hidróxido de sódio e 40% de 1M de acetato de sódio

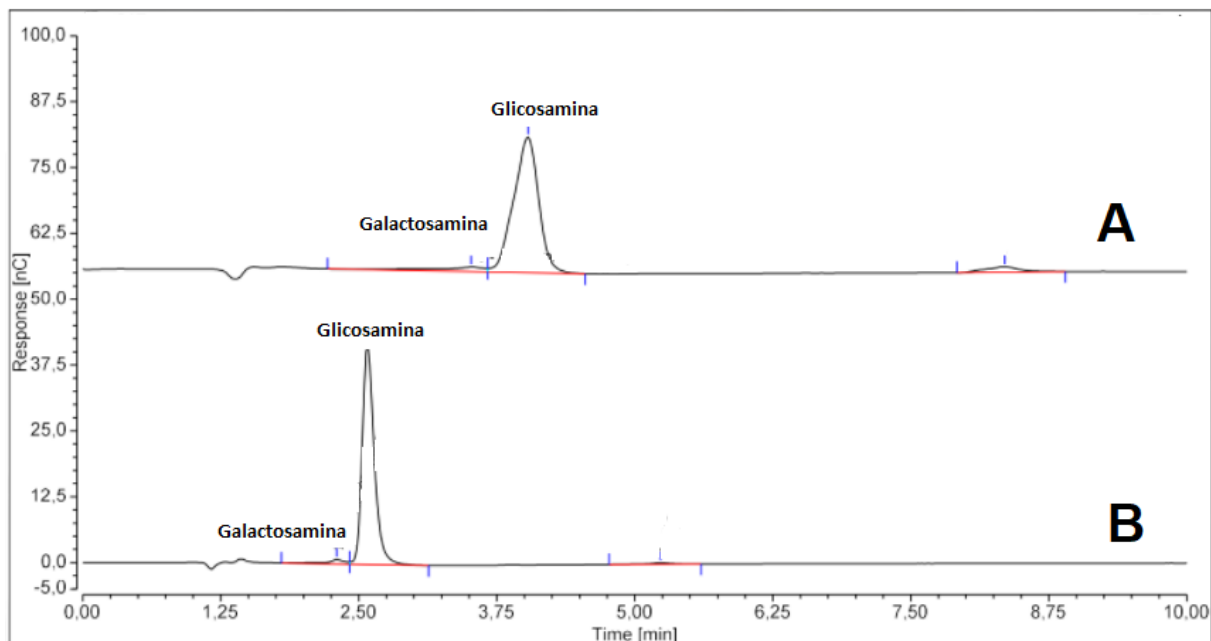
Fonte: (ITOH, 2013; THE UNITED, 2016g).

As colunas cromatográficas em questão são indicadas para separações com alta resolução de monossacarídeos e são funcionalizadas com resina trocadora de ânions de sal de amônio, no entanto a Carbo Pac PA1 (DIONEX-CARBO PAC PA1, 2017) possui comprimento, diâmetro e tamanho de partícula superior a Carbo Pac PA20 (DIONEX-CARBO PAC PA20, 2017), e isso pode provocar uma perda de sensibilidade se comparada ao método de ITOH (2013) e o da Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016g).

4.3.2 Adequação do Sistema Analítico pelo método da Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016g)

O método de ensaio limite contida na Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016g) prevê parâmetros de adequação do sistema necessários para análise das amostras. A solução de adequação do sistema na concentração de 0,8 mg/mL de Glicosamina e 8 µg/mL de galactosamina foi injetada no sistema cromatográfico composto da pré-coluna Aminotrap e sem a pré-coluna Aminotrap, conforme a figura 57 (A e B, respectivamente).

Figura 57 - Cromatograma da solução de adequação do sistema do método da THE UNITED (2016), com o uso da pré-coluna Aminotrap (A) e sem o uso da pré-coluna Aminotrap (B). Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detecção amperométrica pulsada, Fluxo: 0,5 mL/min; Volume de injeção: 10 μ L, tempo de corrida: 10 min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

No primeiro momento, a solução de adequação do sistema foi injetada em um sistema cromatográfico contendo duas pré-colunas, Aminotrap e Carbo Pac PA20, junto com a coluna cromatográfica Carbo Pac PA20. Resultando em um perfil cromatográfico inferior ao esperado (Figura 57- A), com uma péssima resolução. Os tempos de retenção não são semelhantes ao relatado pelo trabalho de HURUM & ROHRER (2009), enquanto nos nossos resultados encontramos 3,52 min para galactosamina e 4,00 min para glicosamina, nos resultados do trabalho supracitado os valores são de 5,51 min e 6,51 min para galactosamina e glicosamina, respectivamente.

Sabe-se que a pré-coluna Aminotrap se deteriora com facilidade ao entrar em contato com água deionizada, essa condição possibilita uma menor resolução nos sinais cromatográficos. Seu uso é facultativo neste método, quando a presença de aminoácidos não é esperada, por isso foi optado pela retirada desta pré-coluna conforme o resultado mostrado na figura 57-B.

Na avaliação do perfil cromatográfico com presença e ausência da pré-coluna (Tabela 14) é possível observar que a assimetria dos picos de galactosamina permanece constante e dentro do permitido pela farmacopeia (entre 0,8 e 2,0), enquanto que da glicosamina repara-se uma pequena diminuição a qual não se enquadra dentro do limite estipulado de 0,8 e 2,0. Já a resolução em ambas as condições está abaixo de 2,0, enquanto o número de pratos teóricos do pico de glicosamina aumenta com a ausência da pré-coluna, respeitando o que é preconizado pelo compêndio (número de pratos teóricos acima de 2000). Devido a falta de parâmetros favoráveis de adequação do sistema não houve prosseguimento com esta abordagem (THE UNITED, 2016g).

Tabela 14 - Avaliação do perfil cromatográfico com presença e ausência da pré-coluna Aminotrap.

Avaliação do perfil cromatográfico				
Coluna Aminotrap	Assimetria		Resolução entre galactosamina/glicosamina	Número de pratos teóricos
	Galactosamina	Glicosamina		Glicosamina
Presente	0,93	0,90	0,90	1467
Ausente	1,39	1,25	1,31	2831

Fonte: (DO AUTOR, 2018).

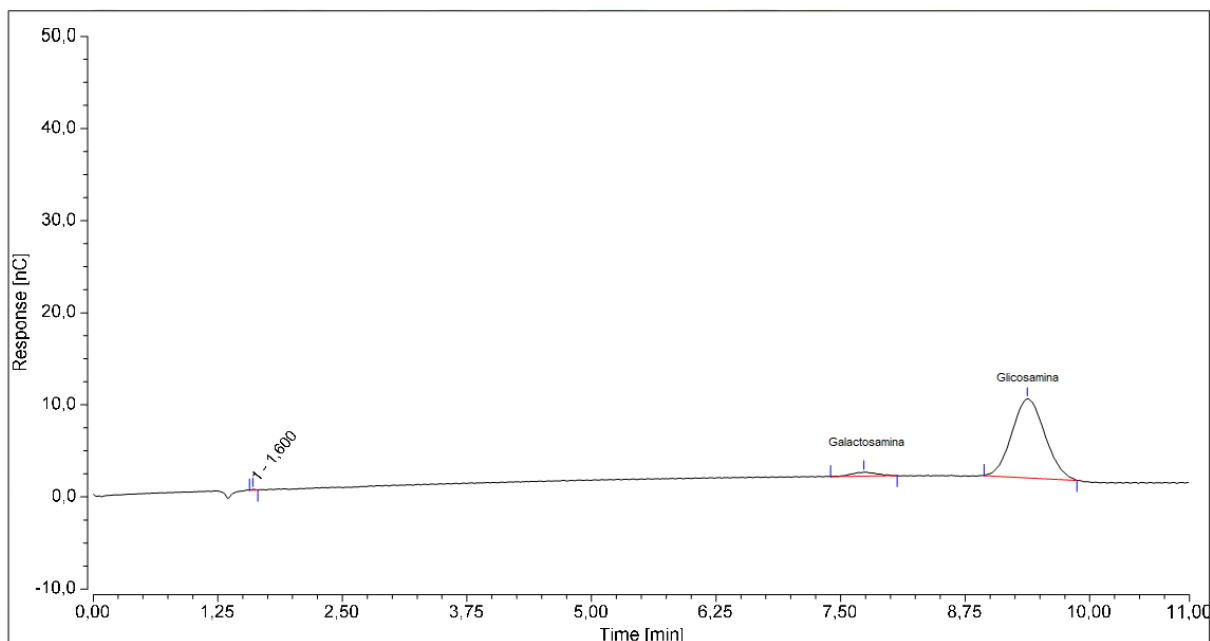
O sinal no tempo de 8,35 min, no cromatograma da figura 57-A e em 5,23 min na figura 57-B, provavelmente está atribuído a algum monômero produzido após a hidrólise ácida do padrão, detectado pelo recuo no tempo de eluição das espécies.

4.3.3 Adequação do Sistema Analítico pelo método de ITOH (2013).

O método de ITOH (2013) não preconiza o uso da pré-coluna AminoTrap, mas optamos pela utilização dela, porque, segundo WEITZHANDLER (2004), esta promove maior estabilidade da linha de base.

Na Figura 58 é possível analisar o cromatograma da solução padrão de galactosamina e glicosamina nas concentrações de 0,06 mg/mL e 0,98 mg/mL em HCl 5N, respectivamente.

Figura 58 - Cromatograma da solução de padrão de 0,06 mg/mL galactosamina e 0,98 mg/mL de glicosamina em HCl 5N. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detecção amperométrica pulsada, Fluxo: 1,0 mL/ min; Volume de injeção: 5 μ L, tempo de corrida: 11 min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

O tempo de retenção para galactosamina está em torno de 7,70 min e para glicosamina, 9,30 min, nos resultados de ITOH (2013) a eluição acontece em aproximadamente 7,00 min e 8,00 min para galactosamina e glicosamina, respectivamente. Essa pequena alteração não inferioriza o sucesso deste método, pois uma maior resolução facilita na integração dos picos.

Foi possível identificar um sinal cromatográfico no tempo de 1,60 min. Este sinal não é visto em ITOH (2013), no entanto nos trabalhos de HURUM & ROHRER (2009) e de RESTAINO (2017), diversos sinais com pouca intensidade neste mesmo tempo de retenção são vistos, provavelmente associados ao ácido clorídrico.

A adequação do sistema preconizada na THE UNITED (2016) é realizada com uma solução padrão de galactosamina e glicosamina de 8 μ g/mL e 0,8 mg/mL, respectivamente. No entanto, neste método não é possível trabalhar com uma concentração de galactosamina tão pequena em virtude de a coluna cromatográfica ser menos sensível.

A fim de avaliar os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico foi utilizada a solução padrão contendo 0,06 mg/mL de galactosamina e 0,98 mg/mL de glicosamina, três replicatas foram realizadas e a média dos resultados é vista na tabela 15. Seguindo os critérios adotados na Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016g), o método foi aprovado e apto para o prosseguimento das análises.

Tabela 15 - Resultado dos parâmetros de adequação do sistema para o método de limite de galactosamina em hexosaminas totais.

Parâmetros de adequação do sistema	Critério de aceitação	Resultado das replicatas	Média entre os resultados	Desvio padrão relativo (%)	
Resolução	≥ 2 entre os picos de galactosamina e glicosamina	3,03	3,01	0,69	
		3,02			
		2,99			
Número de pratos teóricos	≥ 2000 para o pico de glicosamina	3836	3756	2,49	
		3779			
		3653			
Fator de assimetria	Entre 0,8 e 2,0 para os picos de galactosamina e glicosamina	galactosamina	1,13	1,09	3,21
			1,09		
			1,06		
		galactosamina	0,94		
		glicosamina	0,96		
	0,92	0,94	2,13		

Fonte: (THE UNITED, 2016g).

Segundo HURUM & ROHRER (2009), a substituição de hidróxido de potássio por hidróxido de sódio não causaria alterações nos resultados encontrados. Ainda que a coluna cromatográfica Carbo Pac PA1 seja menos sensível do que a Carbo Pac PA 20, nota-se melhores resultados da primeira em relação a segunda.

No trabalho de WEITZHANDLER (2004) foi utilizada uma coluna Carbo Pac PA20 e o detector amperométrico pulsado com eletrodo de ouro descartável e os resultados mostram que o sinal de galactosamina e glicosamina coeluem quando utilizada uma eluição isocrática com 20 mM de NaOH por 12 minutos, este problema é solucionado ao diminuir a concentração da fase móvel para 8mM de NaOH. Após a eluição isocrática, a coluna é lavada por 8 min com 100% de 200 mM de NaOH e reequilibrada por 12 min nas condições iniciais.

Provavelmente a concentração da fase móvel na THE UNITED (2016) impossibilita a otimização na resolução entre os compostos, atrelado a etapa de limpeza e de reequilíbrio do método cromatográfico.

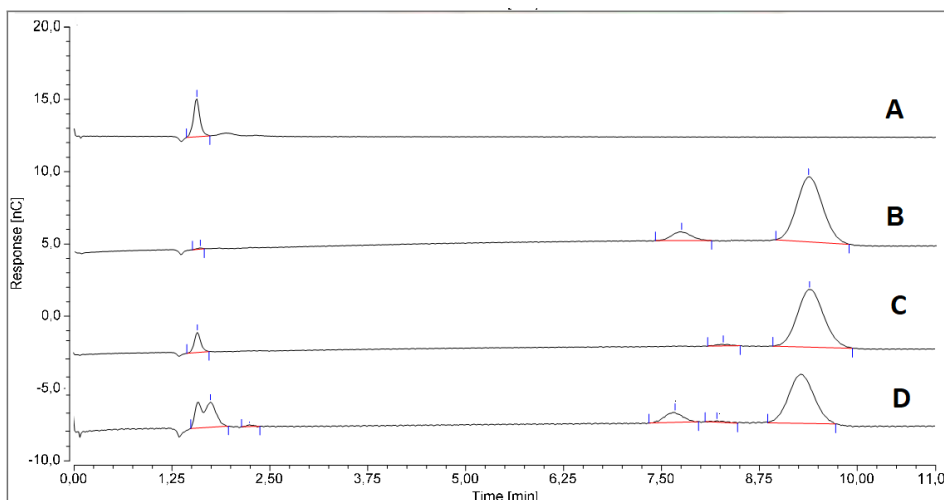
4.3.3.1 Seletividade

A RDC 166/2017 (BRASIL, 2017) preconiza a seletividade em ensaios limite através da comprovação de que exclusiva resposta analítica ao analito, sem interferência de quaisquer outros analitos contidos na amostra, como, diluente, matriz, impurezas, ou produtos de degradação.

Como trata-se de um produto biológico com matriz extremamente complexa, optamos pelo uso de uma amostra de de enoxaparina sódica, uma heparina de baixa massa molar, cujo processo de produção acaba parcialmente com a integridade estrutural, possibilitando assim, avaliar os sinais de galactosamina, glicosamina e possíveis espécies interferentes detectadas pelo método.

Para análise desse parâmetro foi utilizada a amostra de HBMM sem adição padrão e com adição padrão de galactosamina e a estas foram comparadas solução padrão de galactosamina 0,20 mg/mL e glicosamina 0,98 mg/mL em concentrações distintas cujos cromatogramas são mostrados na Figura 59.

Figura 59 - Cromatograma dos resultados do parâmetro seletividade, onde (A) Branco; (B) Solução padrão de galactosamina 0,20 mg/mL e de glicosamina 0,98 mg/mL;; (C) Enoxaparina sódica 2,0 mg/mL sem adição padrão; (D) Enoxaparina sódica 2,0 mg/mL com adição padrão de galactosamina 0,20 mg/mL. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detecção amperométrica pulsada, Fluxo: 1,0 mL/ min; Volume de injeção: 5 μ L, tempo de corrida: 11 min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Observa-se que o sinal proveniente de ácido clorídrico aparece com bastante intensidade na solução de enoxaparina sódica sem adição padrão (Figura 59-C), na Figura 59-D observamos três sinais eluindo entre 1,25 e 2,50 min, um deles certamente está relacionado com o ácido clorídrico utilizado, os outros dois podem estar associados a alguma reação dos componentes da HBMM na hidrólise ácida.

Os sinais referentes a galactosamina e glicosamina são vistos na HBMM em aproximadamente 7,65 e 9,30 min, e um sinal no tempo de 8,35 min, próximo ao sinal de galactosamina é visto nas Figura 59-C e D.

Na produção da enoxaparina é realizada a esterificação parcial com éster benzílico, seguida da despolimerização básica da Hep, resultando em uma mistura polidispersa de oligossacarídeos, os quais sofrem reações secundárias alterando a estrutura molecular (MOURIER, 2016).

Por mais que haja bastante avanço nos métodos analíticos e de separação para o sequenciamento de componentes da enoxaparina, ainda não é possível fazer uma determinação estrutural completa de todos estes componentes. Sabe-se, no entanto, que é conservado 20% das sequências de pentassacarídeos, ao longo da

cadeia do oligossacarídeo que são diretamente responsáveis pelo seu potencial anticoagulante (MOURIER, 2016).

Portanto esse sinal entre galactosamina e glicosamina pode estar associado a uma espécie com pKa intermediário, provavelmente mais semelhante a galactosamina do que ao glicosamina, justificada pela distância de eluição. Este componente intermediário será usado então para o estudo do parâmetro seletividade, onde os resultados foram reunidos na Tabela 16.

Tabela 16 - Resultados dos tempos de retenção para análise do parâmetro seletividade.

Soluções	Galactosamina		Componente intermediário		Glicosamina	
	Tempo de retenção (min)	Média	Tempo de retenção (min)	Média	Tempo de retenção (min)	Média
Padrão 0,20 mg/mL de Galactosamina e 0,98 mg/mL de Glicosamina	7,77	7,75	Não se aplica		9,37	9,38
	7,73				9,39	
	7,75				9,37	
Amostra de 2,0 mg/mL HBMM Sem adição padrão	Não se aplica		8,23	8,28	9,27	9,35
			8,30		9,40	
			8,30		9,38	
Amostra de 2,0 mg/mL HBMM com adição padrão de 0,20 mg/mL de Galactosamina	7,68	7,65	8,23	8,20	9,32	9,27
	7,68		8,22		9,28	
	7,60		8,15		9,23	

Fonte: (DO AUTOR, 2018).

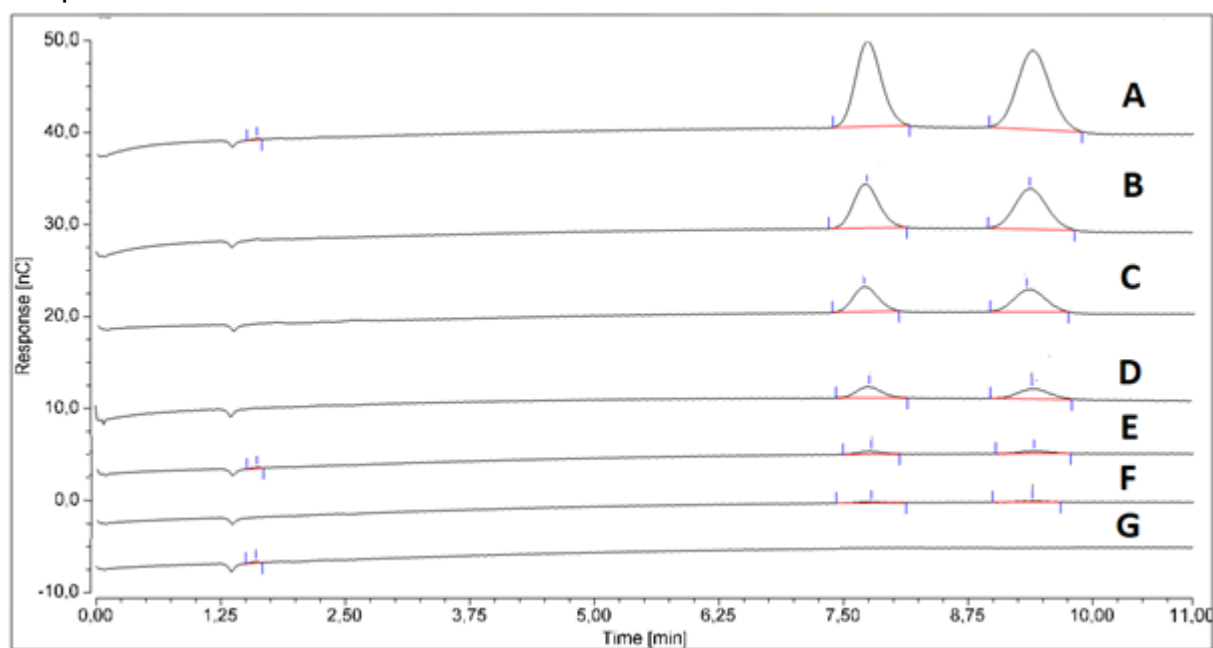
Podemos admitir então que o método é seletivo para galactosamina e glicosamina porque na presença de uma espécie com semelhança estrutural, ainda é possível detectar sem quaisquer interferências, galactosamina e glicosamina.

4.3.3.2 Limite de detecção (LD)

A avaliação do LD foi feita experimentalmente com a injeção em concentrações decrescentes até a ausência dos sinais de galactosamina e glicosamina no cromatograma.

A figura 60 mostra a comparação dos perfis cromatográficos de concentrações distintas de galactosamina e de glicosamina. Podemos observar que na concentração de 0,01 mg/mL de galactosamina e 0,02 mg/mL de glicosamina, houve ausência de sinal cromatográfico nos tempos de retenção específicos.

Figura 60 - Cromatogramas das soluções padrão de galactosamina e glicosamina na concentração de 0,80 e 0,98 mg/mL (A); 0,40 e 0,49 mg/mL (B); 0,20 e 0,25 mg/mL (C); 0,10 e 0,13 mg/mL (D); 0,05 e 0,06 mg/mL (E); 0,03 e 0,03 mg/mL (F); 0,01 mg/mL e 0,02 mg/mL (G). Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detecção amperométrica pulsada, Fluxo: 1,0 mL/ min; Volume de injeção: 5 μ L, tempo de corrida: 11 min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Tabela 17 - Área [nC] do sinal-ruído e dos sinais de padrão de galactosamina e glicosamina.

Área [nC]							
Sinal-ruído	0,024						
Solução padrão de galactosamina (mg/mL) e glicosamina (mg/mL)	0,80 e 0,98	0,40 e 0,48	0,20 e 0,25	0,10 e 0,13	0,05 e 0,06	0,03 e 0,03	0,01 e 0,02
Galactosamina	2,998	1,448	0,790	0,363	0,137	0,066	0,049
Glicosamina	3,465	1,653	0,905	0,412	0,165	0,067	0,047

Fonte: (DO AUTOR, 2018).

Pelo método visual, o cromatograma da solução com concentração de 0,01 mg/mL de Galactosamina e 0,02 mg/mL de Glicosamina não apresenta sinais oriundos dos padrões avaliados. Ao relacionar o sinal- ruído com o sinal da amostra, pelo método da relação sinal-ruído e os resultados da tabela 17, onde o sinal da amostra deve ser maior do que o dobro do sinal do ruído, fica claro que o limite de detecção para o método de ensaio limite é de 0,03 mg/mL para a galactosamina e 0,03 mg/mL para a glicosamina.

4.3.3.3 Resultados das análises das amostras do produto acabado heparina sódica suína

A figura 61 mostra a comparação entre o padrão de 0,40 mg/mL de galactosamina e 0,49 mg/mL de glicosamina as amostras analisadas e repara-se que o pico referente ao HCL 5N, utilizado para a hidrólise, no tempo de 1,60 min se encontra em todos os resultados.

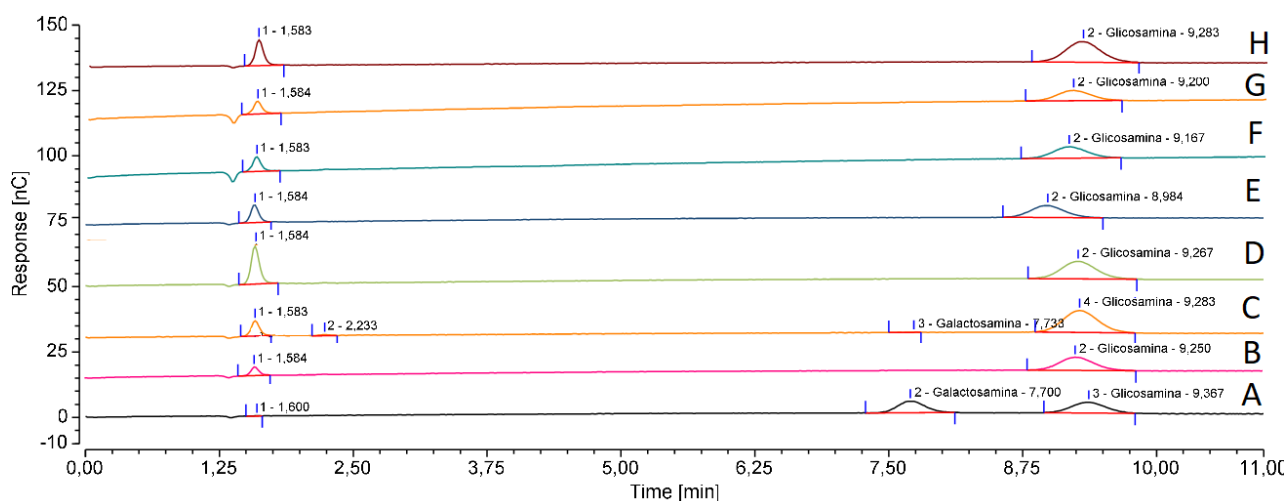
Na Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016g) a solução de adequação do sistema nas concentrações de 8 µg/mL de galactosamina e de 0,8 mg/mL de glicosamina é utilizada para a comparação e cálculos de teor relativo de galactosamina nas amostras, no entanto, a concentração de galactosamina é inferior

ao LD deste método desenvolvido, portanto, optamos pelo uso da solução padrão com uma concentração acima do LD para não interferir nos resultados.

Todas as amostras apresentaram sinal cromatográfico referente a glicosamina, nota-se uma ligeira flutuação do tempo de retenção de 9,1-9,4 min que pode ser atribuído a ineficaz regeneração da coluna após horas de injeção contínua (HARDY, 1989).

Na amostra 2, Figura 61-C, foi detectado pico proveniente a galactosamina no tempo de 7,75 min, e nas amostras subsequentes nenhum pico no tempo de retenção da galactosamina foi detectado, portanto não foi possível encontrar galactosamina dentro do limite de detecção do método que é de 0,03 mg/mL.

Figura 61 - Comparação entre (A) Padrão de 0,40 mg/mL de galactosamina e 0,49 mg/mL de glicosamina; (B) Amostra 1; (C) Amostra 2; (D) Amostra 3; (E) Amostra 4; (F) Amostra 5; (G) Amostra 6; (H) Amostra 7. Sistema cromatográfico com coluna de troca iônica e detecção amperométrica pulsada, Fluxo: 1,0 mL/min; Volume de injeção: 5 μ L, tempo de corrida: 11 min.



Fonte: (DO AUTOR, 2018).

As amostras 3 e 4 que possuíam sinal cromatográfico de DS no método qualitativa, não apresentam sinal de galactosamina no método de ensaio limite, provavelmente a detecção de DS no método de identificação pode ser realizada em concentrações inferiores a 0,03 mg/mL, valor este de LD para o método de ensaio limite.

A ausência de sinal de galactosamina nas amostras 3 e 4, e a baixa intensidade do sinal na amostra 2 também podem ser explicadas pelo desgaste do

eletrodo ao converter óxido de ouro em ouro após sucessivas análises, e este fato interfere diretamente na área dos sinais cromatográficos. Por isso, é necessário realizar uma limpeza oxidativa no eletrodo com periodicidade a fim de que não haja estas interferências (WEITZHANDLER, 2004).

A quantificação relativa de galactosamina, seguindo a Farmacopeia Americana (THE UNITED, 2016) é obtida através da relação entre os sinais cromatográficos de galactosamina e glicosamina no padrão e na amostra, conforme as equações 18 e 19. Onde o critério de aceitação das amostras que possuam sinal cromatográfico de galactosamina é de que este não pode ultrapassar a 1% do sinal de Glicosamina.

$$PGalactosamina/PGlicosamina = \left(\frac{PAGalactosamina}{PMGalactosamina} \right) \times \left(\frac{PAGlicosamina}{PMGlicosamina} \right) \quad (18)$$

$$\text{Resultado} = \left\{ \frac{\left(\frac{AAGalactosamina}{PGalactosamina/PGlicosamina} \right)}{\left[\left(\frac{AAGalactosamina}{PGalactosamina/PGlicosamina} \right) + AAGlicosamina \right]} \right\} \times 100 \quad (19)$$

Sendo assim, $PGalactosamina/PGlicosamina$ seria a razão entre a resposta de galactosamina e glicosamina na Solução padrão; $PA_{Galactosamina}$ é a área do pico de galactosamina da Solução padrão; $PM_{Galactosamina}$ referente a massa de galactosamina da solução padrão; $PM_{Glicosamina}$ seria a massa de glicosamina da solução padrão; PA_{GI} é a área do pico de glicosamina da Solução padrão; $AA_{Galactosamina}$ referente a área do pico de galactosamina da Solução da amostra e, por fim, $AA_{Glicosamina}$ igual a área do pico de glicosamina da Solução da amostra.

Com esta fórmula, foi possível avaliar a amostra 2, onde os resultados de três injeções foram tratados por teste de grubbs ($\alpha=0,05$), conforme visto no APÊNDICE B. Para o cálculo de teor relativo de galactosamina foi utilizado a média dos resultados da solução padrão 0,06 mg/mL de galactosamina e 0,98 mg/mL de

glicosamina e a média dos resultados da amostra 2, de acordo com o APÊNDICE C chegamos ao valor de 0,12% de total de galactosamina em relação às hexosaminas totais do cromatograma, valor dentro do critério estabelecido pela Farmacopeia americana (THE UNITED, 2016g).

5 CONCLUSÃO

Com este trabalho se conclui que o protocolo de dessalinização com a coluna Micro Bio Spin® é o mais eficiente para remover os excipientes das preparações injetáveis de heparina sem comprometer a massa após verificação sob o método de identificação. O método de identificação é seletivo para Hep na presença de DS em uma concentração mais alta e o método de ensaio limite possui seletividade para galactosamina e glicosamina na presença de produto de degradação da HBMM, seu LD de 0,03 mg/mL e 0,03 mg/mL para galactosamina e glicosamina, respectivamente.

A análise qualitativa das sete amostras mostrou sinal de DS em três delas (amostras 2, 3 e 4), sendo uma (amostra 2) com o sinal mais pronunciado, em contrapartida, o método de RMN H^1 evidencia presença de DS nas sete preparações, sendo a amostra 2 com sinal de deslocamento mais intenso, comprovando os resultados pela análise anterior. Já a análise de teor relativo de galactosamina em relação a glicosamina, detectou sinal de galactosamina apenas na amostra 2, com teor de 0,12%, abaixo do limite de 1%, portanto a amostra está aprovada para uso.

Acredita-se que a ausência de detecção galactosamina nas duas amostras restantes esteja associada ao próximo LD entre os dois métodos cromatográficos e ao desgaste do eletrodo do detector. Os resultados obtidos pelos dois métodos cromatográficos complementam-se e promovem uma ampla análise das preparações injetáveis de heparina sódica suína

Sendo considerados simples e econômicos, os métodos já validados serão implementados na rotina do laboratório de biológicos e artigos para saúde, bem como, serão encaminhados para a farmacopeia brasileira como sugestão de monografia para o produto acabado.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Preços máximos de medicamentos por princípio ativo, para compras públicas preço fábrica (Pf) e preço máximo de venda ao governo (Pmvg)**. Brasília: CMED, 2016.

AGUIAR, J.L.N. **Validação intralaboratorial de um novo método analítico por cromatografia em fase líquida do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico em comprimidos**. 2007. 124f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

AQUINO, R.S.; LEE, E.S.; PARK, P.W. Diverse functions of glycosaminoglycans in infectious diseases. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 93, p.373-394, 2010a.

_____ et al. Heparins from porcine and bovine intestinal mucosa: are they similar drugs? **Thrombosis and Haemostasis**, v.103, n.5, 2010b.

ANTICOAGULANT heparin solution. THE UNITED States Pharmacopeia 39. National Formulary 34. Rockville: U.S.Pharmacopeia, 2016. p. 4187.

BRANCO, F.S.C. et al. Ressonância magnética nuclear de substâncias organofluoradas: um desafio no ensino de espectroscopia. **Quim. Nova**, v. 38, n. 9, p.1237-1246, 2015.

BEYER, T. et al. Quality assessment of unfractionated heparin using ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.48, p.13-19, 2008.

_____. Composition of OSCS-contaminated heparin occurring in 2008 in batches on the German Market. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, p.297–304, 2010.

BIO RAD. **Micro Bio-Spin® Chromatography Columns**: Bio Rad, 4006051. Rev B, 2000.

BLOSSOM, D.B. et al. Outbreak of Adverse Reactions Associated with Contaminated Heparin. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, p. 2674-2684, 2008.

BO, S. et al. Sulfation and biological activities of konjac glucomannan. **Carbohydrate Polymers**, v.94, p.899– 903, 2013.

BRASIL. Casa Civil. 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.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 jul. 2017. N. 141, p. 87-89.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas, SP: Ed. da Unicamp, 1987.

CATANI, R. et al. E. Heparina de Alto Massa molar. Uma Alternativa nas operações com circulação extracorporeal: Estudo Experimental. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 16, n. 2, p. 160-170, 2001.

CASU, B. Structure and Active Domains of Heparin. In: GARG, H. G.; LINHARDT, R. J.; HALES C. A. **Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate**. Elsevier, p. 1-28, 2005.

CHAPIN, J.C.; HAJJAR, K.A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood Reviews**, v.29, n. 1, p. 17-24, 2014.

CHMIELEWSKI, A.J. STANLEY, F.E. STALCUP, A.M. The use of SAX-HPLC–CD as a heparin screening strategy. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 2619–2623, 2011.

CHUANG, Y.J. et al. Antithrombin heparin-activates specificity in determinant of factor xa sequence: evidence for an exosite independent of the reactive center loop xa antithrombin for thrombin and factor heparin enhances the specificity of protein structure and folding. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 14961-14971, 2001.

COELHO, T.C. **Síntese e caracterização de heparina de baixa massa molar.** 2004. 33f. Grupo de Pesquisa em Quitinas e Aplicações Tecnológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, fev. 2004.

COHEN, M. The Role of Low-Molecular-Weight Heparins in Arterial Diseases: Optimizing Antithrombotic Therapy. **Thrombosis Research**, v. 100, p. v131–v139, 2000.

COSTA, E.A. **Vigilância sanitária e proteção da saúde.** UFB. 2001. Disponível em: <<http://amazonia.fiocruz.br/arquivos/category/48-vigilancia-sanitaria?download=767:vigilancia-sanitaria-e-protecao-da-saude>>. Acesso em: 02 mar. 2016.

A CROMATOGRAFIA a líquido de alta eficiência. In: FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília, p. 109-114. 2010a. v. 1.

CHROMATOGRAPHY. In: THE UNITED States Pharmacopeia 39. National Formulary 35. Rockville: U.S.Pharmacopeia, 2016a. Cap. 621. p. 1-12.

DALTEPARIN sodium. In: EUROPEAN Pharmacopoeia: supplement 8.5. 2015e.

DALTEPARIN sodium. In: THE UNITED States Pharmacopeia 39. National Formulary 34. Rockville: U.S.Pharmacopeia, 2016c. p. 3361.

DE SIMONE, S.G. **A Arte de purificação e caracterização de proteínas.** [Fortaleza]: Ed. RDS, p. 98-111, 2008.

DIONEX. **Dionex - IonPac AS11 Hydroxide-Selective Anion-Exchange Column.** 2015. Disponível em: <<http://www.dionex.com/en-us/products/columns/ic-rfic/hydroxide-selective-packed/ionpac-as11/lp-73256.html>>. Acesso em: 02 fev. 2015.

_____. **Dionex - CarboPac PA20 Carbohydrate Column.** 2016. Disponível em: <<http://www.dionex.com/en-us/products/columns/bio/carbohydrate/carbopac-pa20/lp-73367.html>>. Acesso em: 02 set. 2016.

DOS ANJOS, D.P. **Avaliação comparativa da atividade biológica de heparinas não-fracionadas pelos métodos da Inibição da Coagulação do Plasma Ovino**

(ICPO) e do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA). 2010. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Pós-graduação em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

DOS SANTOS, W.T.P. et al. Construção e caracterização de um detector eletroquímico para análises em fluxo. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2412-2416, 2009

DU, J.Y. et al. Ion-pairing liquid chromatography with on-line electrospray ion trap mass spectrometry for the structural analysis of N-unsubstituted heparin/heparan sulfate. **Journal of Chromatography B**, v.1028, p.71–76, 2016.

ENOXAPARIN sodium. In: THE UNITED States Pharmacopeia 39. National Formulary 34. Rockville: U.S.Pharmacopeia, 2016d. p. 3692.

FERREIRA, C.N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

FILHO, C.C. et al. Heparinas – momento atual. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 54, n. 6, p. 471-486, 2008.

FILHO, N.A. Desafios na qualidade de heparinas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 31, n. 5, p. 306-307, 2009.

FONDAPARINUX sodium. In: THE UNITED States Pharmacopeia 39. National Formulary 34. Rockville: U.S.Pharmacopeia, 2016e. p. 4035.

ENOXAPARIN sodium. In: EUROPEAN Pharmacopoeia: supplement 8.5. p. 3749-3751, 2015b.

GALEOTTI, F; VOLPI, N. Online reverse phase-high-performance liquid chromatography-fluorescence detection-electrospray ionization-mass spectrometry separation and characterization of heparan sulfate, heparin, and low-molecular weight-heparin disaccharides derivatized with 2-aminoacridone. **Anal. Chem.**, v.83, p. 6770-6777, 2011.

GE HEALTHCARE. HiTrap Desalting: instructions 71-7154-00 AK. Japão, 2007.

GOMES, W.J. BRAILE, D.M. A Busca de Soluções para o Problema das Heparinas no Mercado Nacional. **Rev Bras Cardiol Invas**, v. 17, n. 2, p. 167-168, 2009.

GUERRINI, M. et al. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 6, jun. 2008.

HARDY, M.R. Monosaccharide analysis of glycoconjugates by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Methods In Enzymology**, v.179, p.76-82, 1989.

HASHII, N. et al. Heparin identification test and purity test for OSCS in heparin sodium and heparin calcium by weak anion-exchange high-performance liquid chromatography. **Biologicals**, v.38, p. 539-543, 2010.

HEPARINA cálcica. In: FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. Brasília, p. 1017-1022. 2010b. v. 2.

HEPARIN calcium. In: EUROPEAN Pharmacopoeia: supplement 8.5. p. 4339-4340, 2015c.

HEPARINS, low-molecular-mass. In: EUROPEAN Pharmacopoeia: supplement 8.5. 8th ed. p. 2392-2394, 2015a.

HEPARINA sódica. In: FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. Brasília, p. 1022-1027. 2010c. v. 2.

HEPARIN sodium. In: EUROPEAN Pharmacopoeia: supplement 8.5. p. 4341-4343, 2015d.

HEPARIN sodium. In: THE UNITED States Pharmacopeia 35. National Formulary 30. Rockville: U.S.Pharmacopeia, 2012. p.3403.

HEPARIN sodium. In: THE UNITED States Pharmacopeia 39. National Formulary 34. Rockville: U.S.Pharmacopeia, 2016g. p. 4188.

HEPARIN sodium Injection. In: THE UNITED States Pharmacopeia 39. National Formulary 34. Rockville: U.S.Pharmacopeia, 2016h. p. 4193.

HICHAM, N.J. et al. Glycobiology and Extracellular Matrices: Highly Sulfated Nonreducing End-derived Heparan Sulfate Domains Bind Fibroblast Growth Factor-2 with High Affinity and Are Enriched in Biologically Active Fractions. **J. Biol. Chem.**, v.286, p. 19311-19319, 2011.

HIRSH, J. et al. Parenteral Anticoagulants. Antithrombotic And Thrombolytic Therapy 8TH: ACCP Guidelines. **CHEST**, v. 133, n. 6, p. 141S-159S, jun. 2008.

HOPPENSTEADT, D. et al. Heparin, low-molecular-weight heparins, and heparin pentasaccharide: basic and clinical differentiation. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, v.17, n.1, p. 313-341, fev. 2003.

HURUM, D.; ROHRER, J. Determination of Galactosamine-Containing Organic Impurities in Heparin by HPAE-PAD. **Application Note 233**. Thermo Scientific, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA . **Orientações sobre validação de métodos analíticos**: documento de caráter orientativo. Revisão 3. Rio de Janeiro, fev. 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of analytical procedures**: text and methodology. 2005.

ITOH, S. et al. Determination of galactosamine impurities in heparin sodium using fluorescent labeling and conventional high-performance liquid chromatography. **Biologicals**, v.41, 355-363, 2013.

JUNIOR J.G.S. **Cromatografia de proteínas**: guia teórico e prático. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2004. p. .7

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

KEIRE, D.A. et al. Analysis of crude heparin by ¹H NMR, capillary electrophoresis, and strong-anion-exchange-HPLC for contamination by over sulfated chondroitin sulfate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 921–926, 2010.

KEMSLEY, J. Tainted Heparin's Link To Reactions. **Chemical & Engineering News**, v. 86, n. 49, p. 9, dez. 2008.

KISHIMOTO, T.K. et al. Contaminated Heparin Associated with Adverse Clinical Events and Activation of the Contact System. **N. Engl. J. Med.**, v. 358, p. 2457-2467, jun.2008

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009.

LI, W. et al. Structure of the antithrombin–thrombin–heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. **Nature Structural e Molecular Biology**, v. 11, n. 9, set. 2004.

LIU, L.; LINHARDT, R.J.; ZHANG,Z. Quantitative analysis of anions in glycosaminoglycans and application in heparin stability studies. **Carbohydrate Polymers**, v.xxx106, p. 343-50, 2014.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química nova**, v.32, n.1, p.214-222, 2009.

MEJÍA, M.J.M. **Desenvolvimento e Validação de Métodos Para a Determinação de Aminoglicosídeos em Medicamentos Veterinários**. 2013. 145f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química, Campinas, 2013.

MELO, E.I. et al. Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 23, n. 2, p. 169-174, 2008.

MENAJOVSKY, L.B. Heparin-induced thrombocytopenia: clinical manifestations and management strategies. **The American Journal of Medicine**, v. 118, n.8A, p. 21S-30S, 2005.

MERCK MILIPORE. **Microcon® Centrifugal Filter Devices**. 2013. Disponível em: <http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Microcon-Centrifugal-Filters,MM_NFC113861>. Acesso em: 28 jul. 2015.

MINGHETTI, P. et al. Low molecular weight heparins copies: are they considered to be generics or biosimilars? **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5-6, mar. 2013.

MONAKHOVA, Y.B.; DIEHL B.W.K. Combining ¹H NMR spectroscopy and multivariate regression techniques to quantitatively determine falsification of porcine heparin with bovine species. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.08.017>>. Acesso em: 24 jan. 2018.

MOURÃO, P.A.S. et al. Debate propositivo sobre os biossimilares de enoxaparina no Brasil. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 98, n. 1, p. e11-e14, 2012.

MOURIER, P. et al. Analytical comparison of a US generic enoxaparin with the originator product: The focus on comparative assessment of antithrombin-binding components. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.129, p.542–550, 2016.

MULLOY, B.; MOURÃO, P.A.S.; GRAY, E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **Journal of Biotechnology**, v.77 p.123–135, 2000.

NETO, F.R.A. NUNES, D.S.S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência. p. 57-59, 2003

NOGUEIRA, A.V. **Comparação das atividades anticoagulante e antitrombótica de heparinas bovina e suína de diferentes massas moleculares**. 2013. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

OFOSU, F.A. GRAY, E. Mechanisms of action of heparin: applications to the development of derivatives of heparin and heparinoids with antithrombotic properties. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 14, n. , p. 9-17, jan. 1988.

PAN, J. et al. Oversulfated chondroitin sulfate is not the sole contaminant in heparin. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 203-207, mar. 2010.

PATEL, R.P. NARKOWICZ, C. JACOBSON, G.A. Effective reversed-phase ion pair high-performance liquid chromatography method for the separation and

characterization of intact low-molecular-weight heparins. **Analytical Biochemistry**, v. 387, p. 113–121, 2009.

PATEL, S. BERRY, L.R. CHAN, A.K.C. Covalent antithrombin–heparin complexes. **Thrombosis Research**, v. 120, p. 151–160, 2007.

PÉREZ, M.M. **Regulación por el glucosaminoglicano condroitín sulfato de la neurotransmisión sináptica en cultivos de neuronas de hipoacmapo**. 2014. 166f. Tese (Doutorado em Medicina) - Universidad Autónoma De Madrid, Madrid, 2014.

PROST, D. Heparin fractions and analogues: a new therapeutic possibility for thrombosis. **TIPS**, p. 496-500, dez.1986.

RABENSTEIN, D.L. Heparin and heparan sulfate: structure and function. **Nat. Prod. Rep.**, v. 19, p. 312–331, 2002.

RENAME. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais de 2014**. Ministério da Saúde. Brasília, 2015.

RESTAINO, O.F. et al. A multi-analytical approach to better assess the keratan sulfate contamination in animal origin chondroitin sulfate. **Analytica Chimica Acta**, v.958, p.59-70, 2017.

ROSENFELD, L. PRIOR, M.T. GIRARDI, L.M. Comparison of the separation of bovine heparin by strong anion exchange and by gel filtration chromatography. **Thromb Res.**, v. 64, n. 2, p. 203-211, out. 1991.

SANTOS, M.S.; CONALGO, L.A. Validação De Método Quantitativo Por RMN De ^1H Para Análises De Formulações Farmacêuticas. **Quim. Nova**, v. 36, n.2, p.324-330, 2013.

SANTOS, G.R.C. et al. Structural and functional analyses of bovine and porcine intestinal heparins confirm they are different drugs. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 11, p. 1801-1807, jul. 2014.

_____, A.R. et al. Coagulação Sanguinea E Modelos De Sinalização: Uma Revisão De Literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**, v.11, n.1, p. 20-23, 2015.

SASISEKHARAN, R. RAMAN, R. PRABHAKAR, V. Glycomics Approach to Structure-Function Relationships of Glycosaminoglycans. **Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 181-231, 2006.

SCHWARTZ, L.B. Heparin Comes Clean. **N. Engl. J. Med.**, v. 358, n.23, p. 2505-2509, 2008.

SILVA, R.D.R.; MELO, E.M. A Atual Teoriada coagulação Baseada Em Superfícies Celulares. **Saúde & Ciência Em Ação**, v.2,n.1, p. 79-92, 2016.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Ed. LTC, 2013.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo, SP, 2006. 999 p.

STAICO, R. et al. Heparina Não-Fracionada e de Baixa Massa molar: Equivalência ou Superioridade na Intervenção Coronária Percutânea? **Rev. Bras. Cardiol. Invas.**, v. 12, n. 3, p. 138-145, 2004.

THERMO SCIENTIFIC. **Product Manual for Ion Pac® AG11 and Ion Pac® AS11**: document nº. 034791-12. 1. rev. 2009.

TREHY, M.L. et al. Analysis of heparin sodium by SAX/HPLC for contaminants and impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 670–673, 2009.

VACCARI, S.F. et al. Avaliação comparativa da atividade biológica de heparinas não-fracionadas em produtos farmacêuticos. **Rev. bras. hematol. Hemoter.**, v. 25, n. 2, p. 103-110, 2003.

VALE, R.F.D. **Otimização e validação da determinação do teor de glicose, frutose e manitol em bolsas de sangue por cromatografia em fase líquida**.

2012. 161f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

VALIDATION of compendial procedures. In: THE UNITED States Pharmacopeia 39. National Formulary 34. Rockville: U.S.Pharmacopeia, 2016b. Cap. 1225. p. 1640-1646.

VERLI, H. **Interação heparina-antitrombina III**: reconhecimento molecular caracterizado por ferramentas de modelagem molecular. 2005. 131f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, mai. 2005.

WANG, B. et al. Characterization of currently marketed heparin products: Analysis of heparin digests by RPIP-UHPLC–QTOF-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.67-68, p.42– 50, 2012.

WANG, Z. et al. Liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry for compositional analysis of low molecular weight heparins. **Analytical Biochemistry**, v.451, p.35–41, 2014.

WEITZHANDLER, M. et al. CarboPac™ PA20: a new monosaccharide separator column with electrochemical detection with disposable gold electrodes. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v.60, 309–317, 2004.

WIELGOS, T. et al. Determination of impurities in heparin by capillary electrophoresis using high molarity phosphate buffers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.49, p. 319–326, 2009.

WU, Z.L. et al. A new strategy for defining critical functional groups on heparan sulfate. **The FASEB Journal**, v. 16, p. 539-545, abri. 2002.

_____, J. et al. Establishment of chondroitin B lyase-based analytical methods for sensitive and quantitative detection of dermatan sulfate in heparin. **Carbohydrate Polymers**, v.144, p. 338–345, 2016.

ZANG, Q. et al. Combining ¹H NMR spectroscopy and chemometrics to identify heparin samples that may possess dermatan sulfate (DS) impurities or oversulfated chondroitin sulfate (OSCS) contaminants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 1020–1029, 2011.

YATES, E.A.; RUDD, T.R. Recent innovations in the structural analysis of heparina.
International Journal of Cardiology. v.212, p.S5–S9, 2016. Supl.1.

APÊNDICE A – TRATAMENTO ESTATÍSTICO COM OS TESTES DE SNEDECOR E STUDENT PARA AVALIAÇÃO DE EQUIVALÊNCIA ENTRE AS ÁREAS DA AMOSTRA E DO PADRÃO SEM TRATAMENTO E DO PADRÃO COM E SEM TRATAMENTO

		Amostra	Padrão de Hep	
		Micro-BioSpin	Sem tratamento	Micro-BioSpin
Área do sinal cromatográfico de Hep	Injeção 1	595,68	720,72	734,68
	Injeção 2	592,93	710,20	732,79
	Média (X)	594,31	715,46	733,73
	Desvio padrão	1,94	7,44	1,34
	Variância (S ²)	3,77	55,37	1,79
	Teste de snedecor F		31,00	14,70
	F crítico		161,40	161,40
	F cal< F crí		Homogêneo	Homogêneo
			Padrões não pareados	Amostra e padrão não pareados
	S ^{2a}		28,58	29,57
Teste de Student T		4,75	22,28	
T crítico		12,71	12,71	
		Equivalente	Não equivalente	

$$|F| = \frac{S2^2}{S1^2}, \text{ onde } S2^2 > S1^2$$

$$S^{2a} = \frac{(GL2 * S2^2) + (GL1 * S1^2)}{n1 + n2 - 2}$$

$$|T| = \frac{X2 - X1}{\sqrt{\left(\frac{1}{n2}\right) + \left(\frac{1}{n1}\right) * S^{2a}}}$$

APÊNDICE B – TRATAMENTO ESTATÍSTICO PELO TESTE DE GRUBS PARA REJEIÇÃO DE UM RESULTADO ($\alpha=0,05$) NAS TRÊS INJEÇÕES DA SOLUÇÃO DA AMOSTRA 2 PELO MÉTODO DE ENSAIO LIMITE

Amostra 2	Galactosamina	Glicosamina
	Área (mAU*min)	Área (mAU*min)
Injeção 1	0,012	3,599
Injeção 2	0,014	3,808
Injeção 3	0,020	4,538
Média	0,015	3,982
Desvio Padrão (S)	0,004	0,493
Teste de Grubs para rejeição de um resultado G	1,12	1,13
G crítico	1,15	

$$|G| = \frac{xi - x}{S}$$

Xi = valor analisado

x = média

S = Desvio Padrão

APÊNDICE C – RESULTADO DO CÁLCULO DE TEOR RELATIVO DE GALACTOSAMINA EM RELAÇÃO ÀS HEXOSAMINAS TOTAIS DA AMOSTRA 2

Padrão	Galactosamina	Glicosamina	Amostra	Galactosamina	Glicosamina
	Área (mAU*min)			Área (mAU*min)	
Injeção 1	0,026	3,914	Injeção 1	0,012	3,599
Injeção 2	0,085	3,300	Injeção 2	0,014	3,808
Injeção 3	0,045	3,465	Injeção 3	0,020	4,538
Média	0,052	3,560		0,015	3,982

$$\frac{PGalactosamina}{PGlicosamina} = \left(\frac{0,052}{0,06} \right) \times \left(\frac{3,560}{0,98} \right) = 3,15$$

$$Teor\ relativo\ de\ Galactosamina = \left(\frac{\frac{0,015}{3,15}}{\frac{0,015}{3,15} + 3,982} \right) \times 100 = 0,12\%$$