

# Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular

*Heparin quality control in the Brazilian market: implications in the cardiovascular surgery*

Eduardo I. MELO<sup>1,2</sup>, Mariana S. PEREIRA<sup>1,3</sup>, Rodrigo S. CUNHA<sup>4</sup>, Mauro Paes Leme de SÁ<sup>4,5</sup>, Paulo A. S. MOURÃO<sup>1,2</sup>

RBCCV 44205-970

## Resumo

**Introdução:** A mudança na marca da heparina rotineiramente utilizada nas cirurgias cardíacas no Brasil tem sido acompanhada por aumento do número de casos de discrasia sanguínea, aumento de reoperações e efeitos adversos em nossa Instituição e em outras.

**Métodos:** Foram avaliadas no Laboratório de Tecido Conjuntivo do HUCFF/UFRJ, quatro preparações disponíveis e comparadas à heparina retirada do mercado (Liquemine) e ao padrão de controle internacional. As preparações de heparina foram submetidas à ressonância nuclear magnética para avaliação da integridade estrutural, bem como avaliação de sua eficácia anticoagulante.

**Resultados:** Houve diferença significativa quanto à atividade anticoagulante entre as amostras. Também se observou a presença de contaminação com dermatam sulfato, amostras degradadas quimicamente e com significativa alteração do peso molecular.

**Conclusão:** Das amostras estudadas, nenhuma atendeu aos requisitos de segurança para utilização em cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea. Nenhuma delas apresentou a qualidade semelhante ao Liquemine, não mais disponível no mercado brasileiro.

**Descritores:** Heparina. Revascularização miocárdica. Circulação extracorpórea.

1. Laboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho.
2. Instituto de Bioquímica Médica.
3. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
4. Pós-Graduação em Cirurgia. Departamento de Cirurgia da FM - UFRJ
5. Serviço de Cirurgia Cardiotorácica, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho.

Trabalho realizado no Laboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Esse estudo contou com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Ministério da Saúde e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Endereço para correspondência:

Mauro Paes Leme  
Caixa Postal 68041, Rio de Janeiro, RJ, Brasil – CEP 21941-590.  
E-mail: mpaesleme@oi.com.br/pmourao@hucff.ufrj.br

Artigo recebido em 14 de abril de 2008  
Artigo aprovado em 13 de junho de 2008

### **Abstract**

**Introduction:** The change in the heparin solution trade mark in Brazil that had been commonly used in cardiac surgery has shown increased number in the coagulopathy, re-exploration and other side effects in our Institution and others.

**Methods:** All four different heparin solutions available in the Brazilian market were studied in the Connective Tissue Lab, HUCFF, UFRJ and compared to the Liquemine (out of the market) and the international control solution. All samples were evaluated by magnetic nuclear resonance as well as their anticoagulant effectiveness.

**Results:** There were significant differences among them regarding the anticoagulant activity. It was also observed contamination with other dermatan sulfate, samples chemically degraded and with significant change in the molecular weight.

**Conclusion:** Among the studied samples, none of them can offer security in cardiac surgeries on pump. None of them has demonstrated similar quality to Liquemine, which is not available in the Brazilian market.

**Descriptors:** Heparin. Myocardial revascularization. Extracorporeal circulation.

## INTRODUÇÃO

A heparina é um polissacarídeo sulfatado, usado há mais de 50 anos como droga anticoagulante [1]. Esse polímero, obtido a partir de tecidos animais, seja através da mucosa intestinal suína ou, raramente, pulmão bovino, é o segundo agente terapêutico natural mais utilizado no mundo, superado apenas pela insulina [2]. Foi também graças à descoberta da heparina que ocorreu um dos avanços mais importantes para o desenvolvimento das cirurgias cardíacas, com utilização da circulação extracorpórea (CEC).

Esse anticoagulante, rotineiramente empregado durante a CEC, tem a vantagem de ser bastante específico, não produzir anafilaxia ou alergia, tendo como efeito colateral mais importante a trombocitopenia, raramente fatal e após um uso relativamente prolongado, de 5 a 7 dias.

A heparina não-fracionada contém uma mistura de polissacarídeos com peso molecular entre 3.000 a 30.000 Daltons, atuando na fase final da cascata de coagulação e ativando, concomitantemente, a antitrombina e o co-fator II da heparina. Logo, inibe a trombina e o fator Xa, impedindo a conversão do fibrinogênio em fibrina. A heparina aumenta em até 2.000 vezes a inativação da trombina [3]. Seu antídoto, amplamente empregado em cirurgia cardiovascular, é a protamina.

A anticoagulação sistêmica para CEC é obtida com uma dose inicial de heparina de 3 a 4 mg/kg de peso ou 300-400UI/kg e mantida pela administração de doses suplementares de 0,5 a 1 mg/kg de peso a cada hora de perfusão. Tem sido aceito pela maioria dos serviços que uma anticoagulação adequada durante a CEC deve elevar o tempo de coagulação em 3 a 4 vezes o seu valor basal; desse modo, seriam indicados valores de tempo de coagulação ativado (TCA) iguais ou superiores a 480 segundos.

Até o presente momento, toda a heparina produzida ainda é obtida da mucosa intestinal suína, levando a uma

crescente carência dessa matéria-prima no mercado internacional. Estima-se que, no tratamento das cerca de 20 milhões de pessoas, vítimas de tromboembolismos, são necessários mais de 200 milhões de porcos para atender à demanda de heparina mundial. Ademais, o lançamento da heparina de baixo peso molecular elevou o consumo anual dessas drogas em cerca de 10% a 20% ao ano [4].

Diferentes preparações comerciais de heparina estão disponíveis no mercado brasileiro. Entretanto, a maioria dessas preparações carece de análise detalhada quanto à sua pureza, à sua integridade estrutural e à sua potência anticoagulante. As normas brasileiras prevêm que o controle das preparações de heparina não-fracionada seja baseado, exclusivamente, no teste do tempo de coagulação de plasma citratado. Este método está em desuso [5].

Recentemente, a retirada da preparação de heparina pelo Laboratório Roche no Brasil tem coincidido com maiores taxas de reoperações por sangramentos e discrasia sanguínea pós-operatória em nossa Instituição e em outras. O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade das preparações de heparina disponíveis no mercado brasileiro e utilizadas atualmente nas cirurgias cardiovasculares com circulação extracorpórea.

## MÉTODOS

Todas as heparinas foram sistematicamente submetidas aos testes abaixo descritos. A origem comercial das preparações 2 a 5 não foi identificada. Apenas a preparação 1 é identificada como o Liquemine, produzido pela empresa Roche, que não se encontra mais disponível no mercado e é utilizado como referência em alguns ensaios.

### **1. Tempo Parcial de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT)**

Plasma humano foi coletado numa solução de citrato de

sódio 3,8% na proporção 9:1 e analisado pelo Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT). Resumidamente, 90 µL de "pool" de plasma normal foram incubados por 1 minuto (min.), a 37°C, com 10 µL das soluções de heparina em diferentes concentrações. Após 1 minuto, 100 µL de cefalina ativada (Wiener Lab) foi adicionado à mistura e incubado por mais 2 minutos. Em seguida, 100 µL de CaCl<sub>2</sub> 0,025 M foi acrescentado e o tempo de coagulação foi registrado em um microcoagulômetro Amelung (Alemanha), modelo KC4A.

## 2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se um equipamento Bruker DRX 600, com sonda de ressonância tríplice. Após diálise e liofilização, cerca de 10 mg das diferentes heparinas foram dissolvidas em 0,5 mL de D<sub>2</sub>O 99,9% (Cambridge Isotope Laboratory) e as análises foram realizadas a 600 MHz, 60°C com supressão de água por pré-saturação.

## 3. Cromatografia de Filtração em Gel

A cromatografia de filtração em gel foi realizada utilizando uma coluna Sephacryl S400 HR, com 1,5 cm de diâmetro e 200 cm de altura. A coluna foi pré-equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,2 M, pH 7,0 por 24 h. Ampolas de Lique mine (Roche) e da Preparação 2, contendo 5 mL de solução a 5000 UI/mL, foram então aplicadas nessa coluna e eluídas com o mesmo tampão, utilizando um fluxo de 18,0 mL/min. Frações de 3,0 mL foram coletadas e analisadas pela propriedade metacromática, medindo-se a absorbância a 525 nm em espectrofotômetro (Amersham Biosciences-Ultraspec 3100 *pro*) na presença de azul de 1,9-dimetilmetileno.

## 4. Dosagem de Ácido Hexurônico

A dosagem de ácido hexurônico foi realizada pelo método do carbazol, usando 200 µL de amostra e como padrão a glucuronolactona. Inicialmente adicionou-se 1,0 mL de tetraborato de sódio 0,9% (Merck) em ácido sulfúrico 98% (Merck) sobre a amostra. Esta mistura foi homogeneizada e mantida a 100°C por 12 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo por 5 minutos e então foi adicionado 40 µL de uma solução carbazol (Merck) 0,2% em etanol 100% (Merck). Os tubos foram novamente homogeneizados e mantidos a 100°C por 10 minutos. Finalmente, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos, homogeneizadas e a absorbância medida a 525 nm em espectrofotômetro (Amersham Biosciences-Ultraspec 3100 *pro*).

## RESULTADOS

A Tabela 1 e a Figura 1 mostram que as preparações comerciais de heparina disponíveis no Brasil apresentam

diferenças marcantes na sua atividade anticoagulante. Em alguns casos, observamos apenas 70% daquela quantidade declarada em termos de atividade anticoagulante. Daí observarmos uma quantidade maior de heparina em alguns preparados. O objetivo é de se tentar obter a mesma atividade anticoagulante que os preparados considerados ideais, ou seja, essa observação indica que as heparinas das preparações 4 a 5 possuem uma atividade específica, em UI/mg, significativamente menor do que aquela observada com a preparação 1, Lique mine.

A integridade estrutural das heparinas foi aferida por espectros de RMN. Essa metodologia permite identificar claramente os sinais dos prótons anoméricos, o H5 do ácido idurônico e os prótons do grupamento N-acetil da heparina. Esses prótons são indicados na estrutura da heparina, mostrada na Figura 2. Observamos alterações estruturais significativas em amostras de heparina não-fractionada disponíveis no mercado brasileiro (Figura 3). Cerca de 30% dos resíduos de glucosamina estão 6-O-desulfatados em algumas amostras (Preparações 4 e 5; Figuras 3E e 3F). Essa alteração estrutural resulta em diminuição significativa da atividade anticoagulante da heparina (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade anticoagulante e quantidade de heparina nos frascos de 25.000 UI das preparações comerciais de heparina disponíveis no Brasil.

Preparação	Quantidade (mg/frasco) <sup>a</sup>	Quantidade adicional de heparina/frasco em comparação à preparação 1(mg)	Atividade anticoagulante (IU/mg) <sup>b</sup>
1 (Lique mine)	98,9 ± 6,8	-	253,7 ± 17,5
2	115,9 ± 4,9	17,0	216,0 ± 9,3
3	131,2 ± 12,8	32,3	191,8 ± 19,0
4	137,6 ± 1,0	38,7	181,7 ± 1,3
5	142,0 ± 5,4	43,1	176,2 ± 6,7
Padrão Internacional de heparina (controle)	ND <sup>c</sup>	-	242,6 ± 18,4

<sup>a</sup> A quantidade total de heparina em cada frasco foi determinada pela dosagem de ácido hexurônico, baseada no método do carbazol.

<sup>b</sup> A atividade anticoagulante específica (IU/mg) foi determinada dividindo o valor declarado (25.000 UI) pela concentração total de heparina no frasco.

<sup>c</sup> O padrão internacional de heparina não é disponibilizado em preparação líquida.

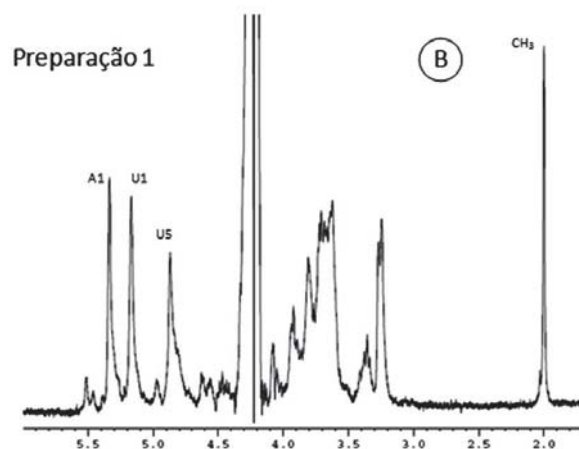
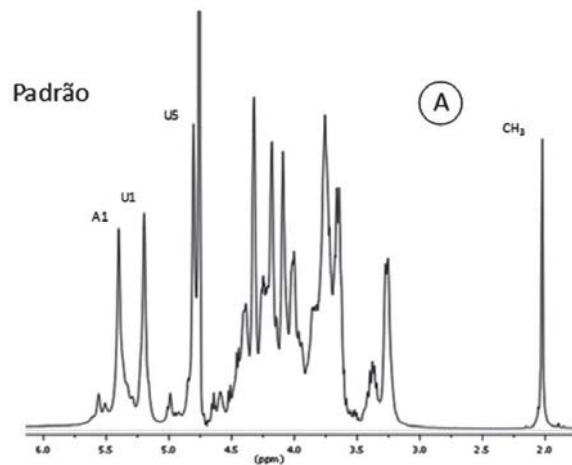
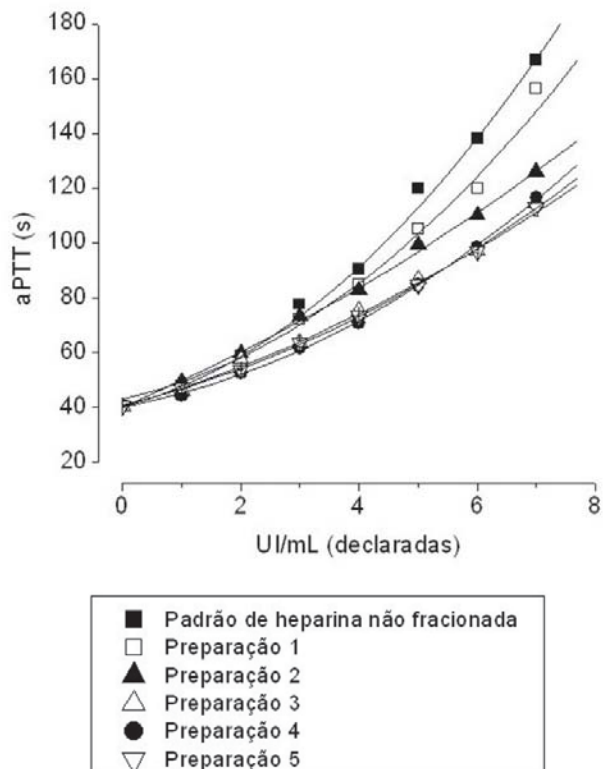


Fig. 1 – Comparação da atividade anticoagulante pelo APTT, em segundos, das diversas preparações de heparina testadas considerando a quantidade (UI) declarada nos frascos pelos respectivos fabricantes. Notar a proximidade da curva entre o padrão internacional e a preparação 1, considerada adequada para as cirurgias com circulação extracorpórea

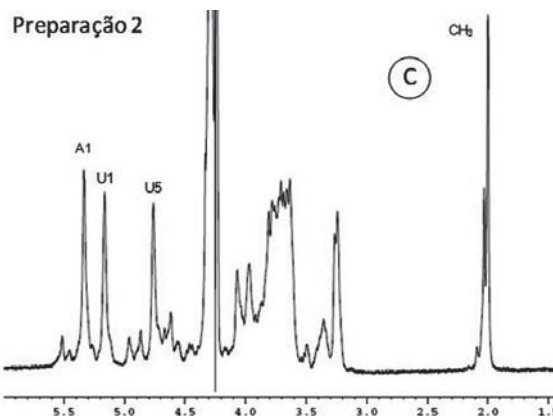
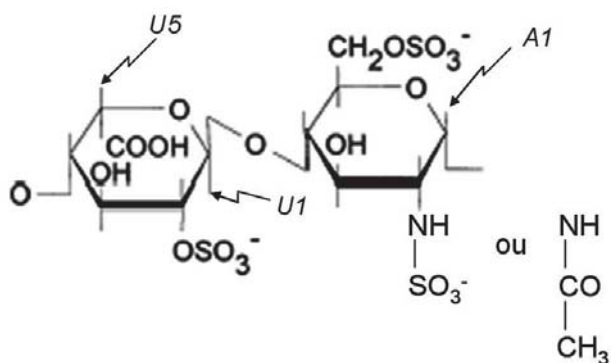


Fig. 2 - Estrutura da heparina. A heparina é majoritariamente constituída por unidades alternadas de ácido idurônico 2-sulfato e glucosamina N- e 6-disulfatada. Alguns resíduos da glucosamina estão N-acetilados. Os prótons facilmente identificáveis nos espectros unidimensionais de RMN são indicados no painel: U1 e A1 são os prótons anoméricos do ácido idurônico e da glucosamina, respectivamente, e U5 é o H5 do ácido idurônico

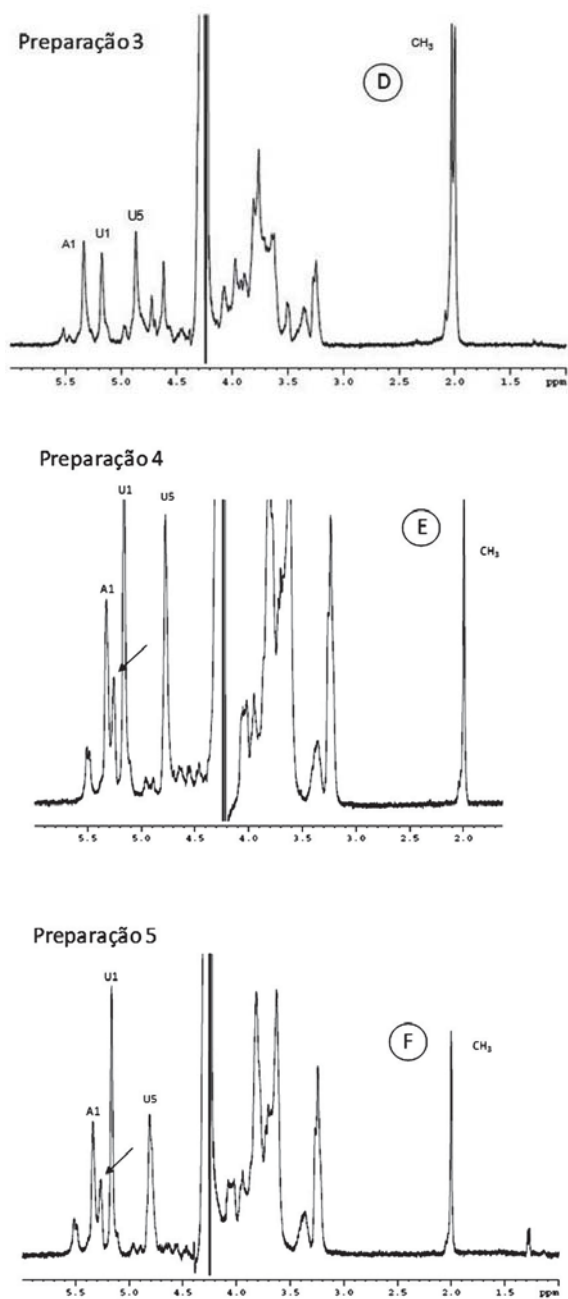


Fig. 3 - Espectro unidimensional de próton do padrão internacional de heparina (A) e de preparações comerciais disponíveis no Brasil (B-F). Observe a semelhança entre os espectros do padrão de heparina (A) e da preparação 1, Liquemine (B). As preparações 2-3 (C e D) contêm um sinal adicional de  $CH_3$ , a aproximadamente 2,00 ppm, devido à contaminação com dermatam sulfato. As preparações 4 e 5 (E e F) contêm um sinal adicional de próton anomérico, indicado pela seta no painel. Estudo detalhado dessas preparações de heparina usando espectros bidimensionais de próton mostrou que esse sinal adicional deve-se à presença de resíduos de glucosamina 6-desulfatados

As preparações 2 e 3 não apresentam alteração estrutural; entretanto, estão, provavelmente, contaminadas com dermatam sulfato, um outro tipo de glicosaminoglicano, também presente no intestino de porco (Figuras 3C e 3D). A presença desse contaminante mostra que, indubitavelmente, a heparina não foi purificada de forma apropriada, apesar do composto não apresentar, aparentemente, efeito tóxico.

Os relatos dos diversos serviços de cirurgia cardiovascular no país que se utilizaram das preparações 2 e 3 foram desfavoráveis quanto ao volume de sangramento, embora uma avaliação quantitativa significativa se faça necessária.

Dentre as análises laboratoriais realizadas no Laboratório de Tecido Conjuntivo do HUCFF - UFRJ, ainda não encontramos preparações de heparina não-fractionada contaminadas com o condroitim *oversulfatado*, conforme já descrito para amostras procedentes dos Estados Unidos e de países da Europa [6].

O peso molecular das preparações 1 (Liquemine) e 2 foi comparado por filtração em gel de Sephacryl S400 (Figura 4). Claramente, a preparação 2 possui um componente com peso molecular menor do que a preparação 1, que corresponde a aproximadamente 20% da mistura.

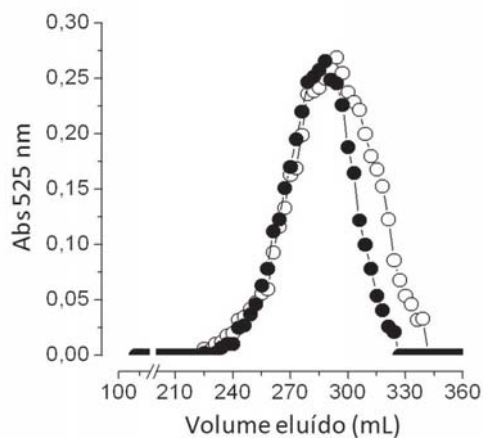


Fig. 4 - Análise comparativa do peso molecular das preparações 1 (●) e 2 (○), através de filtração em gel de Sephacryl S400 - HR

## DISCUSSÃO

Tradicionalmente, no Brasil, a heparina disponibilizada pela empresa Roche (Liquemine, denominada como preparação 1 nesse estudo) era utilizada quase universalmente nas cirurgias cardiovasculares com circulação extracorpórea. Entretanto, a retirada dessa preparação do mercado criou uma situação crítica, levando ao relato por vários serviços de aumento no sangramento pós-operatório e conseqüente reoperações.

O objetivo do presente estudo foi determinar, dentre as preparações que restam disponíveis no mercado brasileiro,

qual seria a heparina não-fracionada mais apropriada para o emprego nas operações com circulação extracorpórea.

Claramente, as preparações 4 e 5 de heparina não são apropriadas porque contêm heparina degradada quimicamente (indicado por um sinal adicional de próton anomérico no espectro de RMN entre A1 e U1, Figuras 3E e 3F), e apresentam atividade anticoagulante reduzida de forma significativa. As preparações 2 e 3 não apresentam alteração estrutural, mas contaminação com dermatam sulfato, um composto provavelmente sem efeito tóxico, mas que revela baixo controle de qualidade.

Os relatos dos serviços de cirurgia cardiovascular que utilizaram essas duas preparações de heparina (2 e 3) foram desfavoráveis, ainda que uma avaliação quantitativa mais significativa se faça necessária.

Nossos resultados indicaram uma quantidade significativamente maior de heparina nos frascos das preparações 2 a 5, em comparação à preparação 1 (Liquemine), retificando que as preparações possuem uma atividade específica (em IU/mg) significativamente menor do que a preparação 1. Esta reduzida atividade anticoagulante pode ser responsável por coagulopatia de consumo durante a utilização da CEC, sendo traduzida clinicamente por quadro clínico de discrasia sanguínea.

Tais resultados levantam uma outra questão intrigante. Por que heparinas não-fracionadas, sem diferenças estruturais significativas, como as preparações 1 e 2, apresentam atividade anticoagulante específica (em IU/mg) distintas?

A elucidação desta questão poderia explicar as diferenças dos efeitos colaterais observados entre as preparações de heparina não-fracionada. A provável resposta nos é apresentada pela Figura 4. Nesse experimento, comparamos os pesos moleculares das heparinas não-fracionadas encontradas nas preparações 1 (Liquemine) e 2. A preparação 2 possui um componente de peso molecular mais reduzido, em comparação à preparação 1, indicado pela região sombreada na Figura 4. Essa fração corresponde a aproximadamente 20% do total da amostra. Coincidentemente, a mesma quantidade de heparina que foi adicionada à preparação 2, em comparação à preparação 1, para assegurar a atividade anticoagulante declarada no frasco (Tabela 1).

A explicação para tal resultado é a de que a fração de peso molecular mais reduzido não responde ao teste de coagulação, especialmente o APTT. Conseqüentemente, essa heparina não-fracionada não é neutralizada pela protamina, ao término da circulação extracorpórea; uma vez que não é detectada no teste de APTT, persiste em circulação e, portanto, pode acarretar o sangramento per e pós-operatório dos pacientes.

Para o uso seguro da heparina não-fracionada em pacientes, durante os procedimentos dependentes de circulação extracorpórea, nossos resultados apontam a necessidade de se assegurar aos profissionais médicos preparações que

tenham pureza química garantida, isenção de contaminantes e elevada atividade anticoagulante específica.

## CONCLUSÕES

O mercado mundial de heparina apresenta um quadro complexo no panorama atual. O crescente rigor na análise das preparações de heparina não-fracionada, principalmente nos Estados Unidos e na Europa, pode estimular produtores de países orientais a enviarem suas preparações, de menor qualidade, para países pouco rigorosos na análise destas moléculas.

Recentemente, outros países relataram efeitos adversos observados na utilização de heparina que foram atribuídos à contaminação das preparações por um condroitim oversulfatado [6].

Falta-nos também uma regulamentação específica para a análise de preparações de heparina por métodos modernos e apropriados. Também há desinteresse dos fornecedores no controle da qualidade da heparina não-fracionada que disponibilizam no mercado interno. Ademais, carecemos de avaliação clínica criteriosa, por meio de critérios quantitativos, das heparinas usadas nos hospitais.

Assim, nenhuma das amostras avaliadas atendeu aos requisitos necessários da proposição acima, ou seja, pureza química, isenção de contaminantes e elevada atividade anticoagulante específica, como no caso da preparação 1 (Liquemine).

## REFERÊNCIAS

1. Crafoord C, Jorpes E. Heparin as a prophylactic against thrombosis. *JAMA*. 1941;116:2831-5.
2. Jin L, Abrahams JP, Skinner R, Petitou M, Pike R, Carrel RW. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(26):14683-8.
3. Ofuso FA, Gray E. Mechanisms of action of heparin: applications to the development of derivatives of heparin and heparinoids with antithrombotic properties. *Semin Thromb Hemost*. 1988;14(1):9-17.
4. Alban S. The 'precautionary principle' as a guide for future drug development. *Eur J Clin Invest*. 2005;35(Suppl 1):33-44.
5. Hirsh J, Raschke R. Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004;126(3 Suppl):188S-203S.
6. Kishimoto TK, Viswanathan K, Ganguly T, Elankumaran S, Smith S, Pelzer K, et al. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *N Engl J Med*. 2008;358(23):2457-67.