



Vigilância Sanitária em Debate

ISSN: 2317-269X

INCQS-FIOCRUZ

Santana, Andreza da Costa de; Marinho, Anna Carolina Machado; Lima, Patrícia Condé de; Leitão, Ozéias de Lima; Fonseca, Debora Alves; Teixeira, Raíssa Lamin; Conceição, Cláudia Maria da; Jacob, Silvana do Couto

Análise de limite de galactosamina em hexosaminas totais em amostras injetáveis de heparina sódica suína

Vigilância Sanitária em Debate, vol. 6, núm. 2, 2018, Abril-Junho, pp. 61-66  
INCQS-FIOCRUZ

DOI: <https://doi.org/10.22239/2317-269X.01033>

Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=570562984009>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais informações do artigo
- Site da revista em [redalyc.org](http://redalyc.org)

UABM [redalyc.org](http://redalyc.org)

Sistema de Informação Científica Redalyc

Rede de Revistas Científicas da América Latina e do Caribe, Espanha e Portugal

Sem fins lucrativos acadêmica projeto, desenvolvido no âmbito da iniciativa  
acesso aberto

# Análise de limite de galactosamina em hexosaminas totais em amostras injetáveis de heparina sódica suína

## Galactosamine limit analysis in total hexosamines in injectable porcine sodium heparin samples

Andreza da Costa de Santana\*  
Anna Carolina Machado Marinho  
Patrícia Condé de Lima  
Ozéias de Lima Leitão  
Debora Alves Fonseca  
Raíssa Lamin Teixeira  
Claudia Maria da Conceição  
Silvana do Couto Jacob

### RESUMO

**Introdução:** A pesquisa, uma das vertentes da vigilância sanitária, tem sua importância justificada pela busca de respostas aos diversos prejuízos relativos à saúde. A heparina, produto biológico com propriedades anticoagulantes e antitrombóticas, esteve relacionada com eventos adversos entre 2007 e 2008. Diante do ocorrido, os compêndios oficiais atualizaram a monografia para matéria-prima. No entanto, há uma deficiência de monografias para avaliação do produto final. **Objetivo:** Propor método físico-químico de análise de limite de galactosamina em hexosaminas totais a partir do produto acabado de heparina sódica suína. **Método:** Foi desenvolvido método analítico a partir da cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica e detecção amperométrica, com as devidas avaliações de adequação do sistema para posterior análise de três amostras de heparina sódica suína, as quais foram previamente submetidas ao protocolo de preparo de amostra através da coluna Micro Bio-Spin™. **Resultados:** As amostras foram comparadas com a solução de adequação do sistema e matéria-prima de heparina sódica suína, sendo possível detectar presença de galactosamina em uma das três amostras analisadas em quantidade inferior ao limite estipulado pela Farmacopeia Americana. **Conclusões:** Conclui-se que o método é eficiente para análise do produto acabado e, por isso, será sugerido à Farmacopeia Brasileira.

**PALAVRAS-CHAVE:** Heparina; Controle de Qualidade; Cromatografia Líquida de Alta Pressão; Vigilância Sanitária

### ABSTRACT

**Introduction:** Research, one of the core areas of health surveillance, has its importance justified by its search for answers to various health problems. Heparin, a biological product with anticoagulant and antithrombotic properties, has been related to adverse events between the years 2007-2008. Because of that, the official compendiums updated the monograph for raw material. However, there is a lack of monographs that evaluate the final product. **Objective:** The goal of this study is to propose a physicochemical method of analysis of the limits of galactosamine in total hexosamine from the finished product of porcine sodium heparin. **Method:** We developed an analytical method from the ion-exchange high performance liquid chromatography with amperometric detection, with the appropriate evaluations of the system suitability for posterior analysis of three samples of porcine sodium heparin previously submitted to the sample preparation protocol through the Micro Bio-Spin column. **Results:** The samples were compared to the solution of the system suitability and raw material of porcine sodium heparin. We could detect the presence of galactosamine in one of the three analyzed samples in lower amounts than the limit stipulated by the American pharmacopeia. **Conclusions:** We concluded that the aforementioned method is efficient for the analysis of the finished product and that is the reason why it will be suggested to the Brazilian pharmacopeia.

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\* E-mail: andreza.santos.costa07@gmail.com

Recebido: 04 set 2017  
Aprovado: 13 abr 2018

**KEYWORDS:** Heparin; Quality Control; High Pressure Liquid Chromatography; Health Surveillance



## INTRODUÇÃO

As funções da vigilância sanitária não se restringem apenas à fiscalização do cumprimento da legislação sanitária e repreensões. A pesquisa é uma vertente pouco difundida e investida, porém sua importância se justifica na articulação das ações intersetoriais a fim de que se produza conhecimento e na busca de respostas aos diversos prejuízos relativos à saúde<sup>1</sup>. Quando um determinado produto tem sua credibilidade e reputação fragilizada, as instituições reguladoras direcionam sua atenção para o tema com a finalidade de pesquisar o dano sanitário estabelecido<sup>2</sup>. É o caso do produto biológico heparina, um dos polissacarídeos lineares com estrutura mais complexa da família dos glicosaminoglicanos, que inclui também o sulfato de condroitina (SC) e o dermatan sulfato (DS)<sup>3</sup>. A heparina possui propriedades anticoagulantes e antitrombóticas amplamente difundidas há mais de seis décadas. A extração comercial ocorre a partir da mucosa intestinal de suínos ou do tecido pulmonar de bovinos, entretanto, não são fármacos equivalentes. No final de 2007 e início de 2008, a confiabilidade deste produto biológico foi comprometida depois dos episódios relatados pela *Food and Drug Administration* (FDA), em que cerca de 350 casos de eventos adversos, devido ao uso de heparina suína fabricada pela empresa *Baxter Healthcare Corporation* nos Estados Unidos, foram registrados<sup>4</sup>. A investigação da composição das amostras suspeitas concluiu que existia teor de 20% de condroitina supersulfatada (OSCS) e mais de 1% em peso de DS. Autores apontam que a exposição a determinados vírus suínos desencadeia a produção de pequenas quantidades de OSCS, mas nada comparado a grande quantidade encontrada nestes lotes<sup>5,6</sup>. Por meio da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) foi elucidada a estrutura da OSCS, composta por unidades repetidas dissacarídicas de ácido D-glicurônico e N-acetilgalactosamina, ligadas da forma B (1 → 3), análoga ao sulfato de condroitina, porém com um padrão peculiar de sulfatação encontrado nas posições 2 e 3 do ácido glicurônico e em 4 e 6 da N-acetilgalactosamina<sup>7</sup>. Sabe-se que o SC é composto de ácido D-glicurônico ligado de forma B (1 → 3) à N-acetilgalactosamina, normalmente, sua estrutura possui um grupo sulfato nas posições 4 ou 6 na porção da N-acetilgalactosamina. Enquanto que o DS tem em sua estrutura ácido L-idurônico ligado B (1 → 3) à N-acetilgalactosamina, com grupos sulfatos presentes no carbono 2 do ácido urônico e no carbono 4 da N-acetilgalactosamina. A heparina é constituída principalmente de ácido L-idurônico e N-sulfoglicosamina ligados de forma B (1 → 4), altamente substituída com resíduos O-sulfato no carbono 6 dos resíduos de glicosamina e no carbono 2 dos resíduos de ácido urônico<sup>8</sup>. Na época, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) liberou um informe no qual a empresa *Baxter Healthcare Corporation* notificava que os lotes envolvidos nos casos americanos não haviam sido distribuídos ou comercializados no Brasil<sup>9</sup>. No entanto, ficou evidente a necessidade de procurar métodos seguros que pudessem atestar mais fielmente a qualidade do produto oferecido à população, levando os compêndios oficiais a atualizarem suas monografias de heparina. Neste contexto, a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. contém monografias para heparina cálcica<sup>10</sup> e sódica<sup>11</sup>, cujo princípio ativo e finalidade são os mesmos, mas as duas são destinadas para matéria-prima e não para o produto acabado. Observa-se que as monografias pertencentes à Farmacopeia Brasileira 5ª ed.<sup>10,11</sup> são semelhantes à da Farmacopeia Europeia 8ª ed.<sup>12,13</sup>, na qual há ausência de métodos para a forma injetável. Em contrapartida, a Farmacopeia Americana USP39-NF34 é mais abrangente a

respeito de monografias para heparinas com formas farmacêuticas distintas: matéria-prima<sup>14</sup> e injetável<sup>15</sup>. Entre os métodos cromatográficos abordados para a matéria-prima, encontra-se a análise de limite de galactosamina em hexosaminas totais, técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna de troca iônica e detecção amperométrica pulsada, também estudado por Itoh et al.<sup>16</sup>. Enquanto que, para heparina injetável, na Farmacopeia Americana USP39-NF34<sup>15</sup>, há ausência de métodos cromatográficos preconizados. Este fato nos mostrou a importância de desenvolver métodos, a fim de que haja abrangência no controle de qualidade tanto na matéria-prima quanto no produto acabado. O produto acabado possui peculiaridades que precisam ser avaliadas, como, por exemplo, a composição dos excipientes. Neste caso, as amostras de heparina sódica suína possuem como excipientes cloreto de sódio, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, álcool benzílico e água para injeção, destes o sal é o mais problemático quando se trata de análise por cromatografia de troca iônica. Este excipiente pode concorrer pelo sítio de interação da fase estacionária com o analito, interferindo assim na análise, por isso as amostras necessitam passar por um tratamento de dessalinização a fim de que os sais presentes na formulação sejam removidos. Sendo assim, este trabalho teve como objetivos propor método de análise físico-química de limite de galactosamina em hexosaminas totais a partir do produto acabado de heparina sódica suína, bem como otimizar o preparo de amostra.

## MÉTODO

### Padrões e reagentes

Galactosamina e glicosamina fornecidas pela *United States Pharmacopeia* (USP). Acetato de sódio, grau para análise, ácido clorídrico 37% e solução de hidróxido de sódio 50%; fornecidos pela Merck. Hidróxido de Potássio, grau para análise fornecido pela Fluka. Água foi deionizada pelo sistema de purificação Milli-Q e filtrada em filtro Millipak® Express 40 (MPGP04001).

### Condições cromatográficas

O equipamento consiste de um cromatógrafo líquido de alta eficiência contendo uma bomba quaternária modelo DIONEX ICS-5000 + SP com degaseificador acoplado, um detector amperométrico pulsado junto ao forno para colunas DIONEX ICS-5000 + DC, um injetor automático DIONEX-AS AP e *software* chromeleon versão 7.0, todos do fabricante *Thermo Fisher Scientific*. Adaptações nas condições cromatográficas de Itoh et al.<sup>16</sup>, em que a fase móvel era composta de 8 mM de hidróxido de sódio (Eluição isocrática por 11 min), a etapa de limpeza foi feita com 60% de 8 mM de hidróxido de sódio e 40% de 1 M de acetato de sódio, e a etapa de equilíbrio aconteceu com 10 min de fase de eluição entre as injeções, todas as etapas permanecendo em velocidade constante de 1,0 mL/min. As amostras foram eluídas com volume de 5 µL em um sistema composto por: Pré-coluna Amino-Trap™, com dimensões de 3 x 30 mm; Pré-coluna Borate-Trap™, com dimensões de 4 x 50 mm; Coluna de troca iônica CarboPac™ PA1, com dimensões de 4 x 250 mm, mantida a 30°C. Coluna e pré-colunas fornecidas pela Dionex. A detecção amperométrica pulsada seguiu a programação da Tabela 1.



Tabela 1. 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	-

min: minutos; V: volts.

### Amostras e matéria-prima

Foram utilizadas três amostras injetáveis e uma matéria-prima de heparina sódica suína adquiridas junto aos produtores, com o auxílio do Núcleo Técnico de Medicamentos Biológicos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade da Fundação Oswaldo Cruz. As amostras foram identificadas, catalogadas e armazenadas sob refrigeração entre 6 °C e 10 °C, até o momento dos ensaios.

#### 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 de glicosamina em 5 N de ácido clorídrico e solução padrão USP de 1,6 mg/mL de galactosamina em 5 N de ácido clorídrico. Volumes iguais das soluções de glicosamina e galactosamina foram vertidos em um tubo de rosca, e a esta solução final é dado o nome de solução de adequação do sistema. Por último, 5 mL da solução de adequação são hidrolisados por 6 h a 100 °C, que, após arrefecimento, foram diluídos com água purificada do Tipo I na proporção de 1:100.

### Preparo da matéria-prima

Foram pesadas aproximadamente 2,4 mg de matéria-prima heparina sódica suína, que foram diluídas em 1,0 mL de HCl 5 N e hidrolisadas por 6 h a 100 °C e, após arrefecidas, foram diluídas com água purificada do Tipo I na proporção de 1:100.

### Preparo da amostra

#### Protocolo de dessalinização

A coluna Micro Bio-Spin™ 6, utilizada para remoção de sais de uma determinada amostra, por reter moléculas que possuem massa molar inferior a 6 kDa, foi utilizada para o preparo das amostras injetáveis de heparina. A coluna acondicionada em tampão necessita de uma etapa de remoção desta solução e uma etapa de adição do analito para rinsar a coluna, a fim de que não haja contaminação com a amostra. Essa coluna satura com 75 µL de volume adicionado, desta maneira, o processo de dessalinização deve ocorrer no mínimo 11 vezes para que haja volume necessário para dar prosseguimento a análise.

### Hidrólise da amostra

a solução previamente dessalinizada foram vertidos 100 µL para um recipiente e então a secagem foi realizada no SpeedVac por 4 h, sem

aquecimento, com vácuo de 0,1 vac e temperatura do trap de -90 °C. Após a secagem, os tubos utilizados foram pesados e a diluição aconteceu de forma a atender a proporção da Farmacopeia Americana USP39-NF34<sup>14</sup>, cuja relação é de 12,0 mg de heparina sódica para 5 mL de 5 N de ácido clorídrico. Estas soluções foram hidrolisadas por 6 h a 100 °C e, ao esfriarem à temperatura ambiente, foram filtradas em membrana Milipore Millex 0,22 µm, em seguida diluídas com água purificada do Tipo I na proporção de 1:100.

### Adequação do sistema

#### 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)<sup>17</sup> (Equação 1).

$$Rs = \frac{2(\text{Tr})_A - (\text{Tr})_B}{(W)_A + (W)_B} \quad \text{Equação 1}$$

#### Eficiência ou número de pratos teóricos (N)

Parâmetro definido como equilíbrio de distribuição do soluto entre as duas fases: móvel e estacionária. Mede-se o alargamento que o sinal sofre durante a passagem do analito pelo sistema, e é um valor constante para cada pico em um cromatograma com um determinado conjunto de condições operacionais. Este parâmetro é calculado conforme Equação 2, na qual Vn é o volume de eluição do pico e W é a largura do pico na linha de base<sup>18</sup>.

$$N = \left[ 16 \cdot \left( \frac{V_n}{W} \right) \right]^2 \quad \text{Equação 2}$$

#### Fator de assimetria do pico (As)

O parâmetro mede a assimetria do pico, pois este parâmetro é inversamente proporcional à exatidão da quantificação, dificultando determinar o tempo e a posição de início e término do pico<sup>18</sup>. A Equação 3 mostra o cálculo para fator de assimetria, no qual W<sub>0,05</sub> é a largura do pico a 5% da altura e f é a distância da linha vertical do sinal máximo até a linha vertical e perpendicular à linha de base que intercepta o traço a 5% da altura.

$$As = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad \text{Equação 3}$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de OSCS e o alto teor de DS em uma amostra de heparina indicam má qualidade e o seu consequente descarte. Para a avaliação da presença ou ausência de OSCS e DS, pode-se utilizar o método de limite de galactosamina em hexosaminas totais. Neste método, a amostra é hidrolisada e convertida em monossacarídeos e espera-se encontrar apenas glicosaminas provenientes da estrutura da heparina, pois a galactosamina advém de impurezas como o DS e adulterantes como a OSCS. De forma relativa consegue-se quantificar o teor de galactosamina presente na amostra, a partir do sinal de glicosamina. A separação cromatográfica ocorre pelo fenômeno da troca iônica e a detecção é realizada pelas reações de oxirredução ocorridas entre



o analito e a célula do detector amperométrico pulsado a partir de diferença de potencial empregado na análise. Cabe ressaltar que o padrão necessita passar pelo mesmo processo de hidrólise para que seja submetido às mesmas condições da amostra. O método contido na Farmacopeia Americana USP39-NF34 não obteve resultados que atendessem aos critérios de adequação do sistema do próprio compêndio, por isso eles não foram mostrados neste trabalho. O método abordado por Itoh et al.<sup>16</sup> possui semelhanças com o da Farmacopeia Americana USP39-NF34<sup>14</sup> em relação ao preparo da amostra, que, em ambos os casos, reporta-se à matéria-prima. A Tabela 2 reúne as principais diferenças entre os métodos, que envolvem basicamente, a fase móvel e a coluna cromatográfica.

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<sup>19</sup> possui comprimento, diâmetro e tamanho de partícula superior aos da Carbo Pac PA20<sup>20</sup>. Ao se tratar de monossacarídeos extremamente substituídos, a interação com partículas maiores é mais estabilizada do que com as menores, facilitando assim a separação cromatográfica. Segundo o fabricante do cromatógrafo líquido *Thermo*

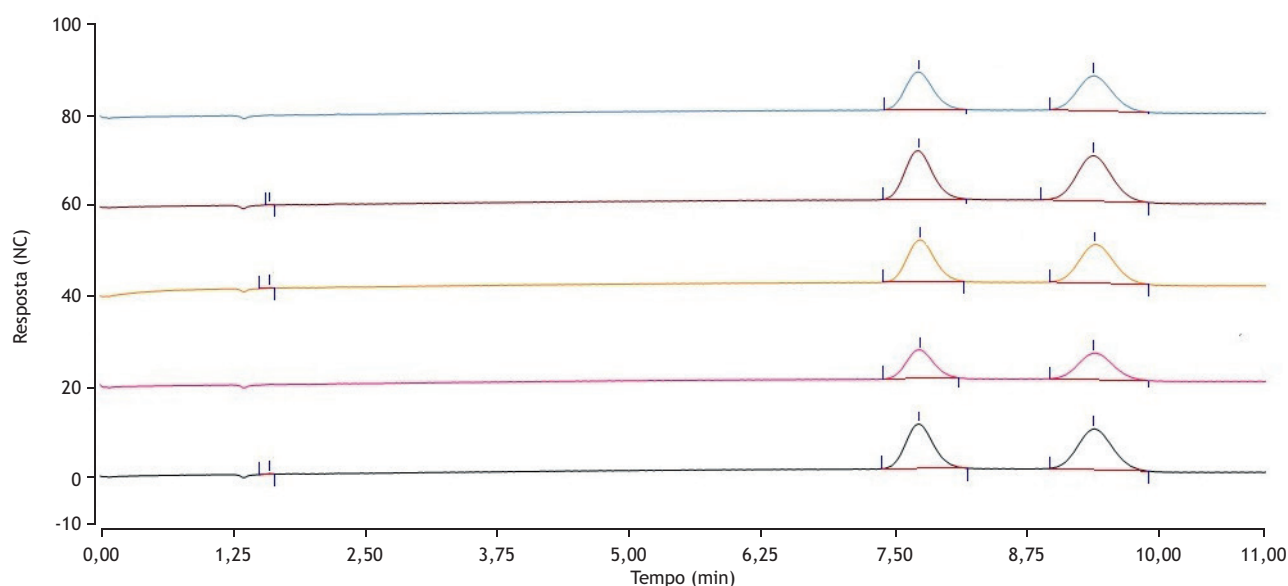
*Fisher Scientific*<sup>21</sup>, o qual reproduziu o método da Farmacopeia Americana USP39-NF34<sup>14</sup>, a substituição de hidróxido de potássio por hidróxido de sódio não causaria alterações nos resultados encontrados. Sendo assim, o sucesso deste método pode ser atribuído à coluna cromatográfica e à etapa de lavagem. A Figura 1 mostra a comparação entre cinco injeções da solução de adequação do sistema com o método adaptado de Itoh et al.<sup>16</sup>, no qual foram observados tempos de retenção de aproximadamente 7,75 e 9,50 min para galactosamina e glicosamina, respectivamente. Em algumas injeções, um sinal não identificado no tempo de 1,60 min pode ser detectado. Os dados foram tratados pelo Teste de Grubbs e a injeção 3 foi descartada por apresentar valores aberrantes ( $\alpha = 0,05$ ).

Os parâmetros de adequação do sistema para o método em questão seguiram os abordados na Farmacopeia Americana, com a finalidade de avaliar se o sistema cromatográfico está adequado para a análise. A Tabela 3 resume os dados para avaliação.

Para todos os critérios avaliados, o método foi aprovado e, portanto, apto a ser testado para as amostras. A Figura 2 mostra a comparação entre branco, solução de adequação do sistema, matéria-prima e amostras analisadas, na qual pode ser observado que o pico referente ao tempo de 1,60 min continua a ser detectado, levantando a hipótese de que pode estar relacionado com o ácido clorídrico utilizado para a hidrólise, pois se encontra não só no padrão, matéria-prima e nas amostras, como também no branco. Este pico não é detectado no trabalho de Itoh et al.<sup>16</sup>, mas foram observados sinais próximos ao volume morto nos estudos da *Thermo Fisher Scientific*<sup>21</sup> e de Restaino et al.<sup>22</sup>. Nos resultados da *Thermo Fisher Scientific*<sup>21</sup>, em que foi reproduzido o método da Farmacopeia Americana USP39-NF34<sup>14</sup>, assim como em Restaino et al.<sup>22</sup>, o qual estudou o comportamento cromatográfico de outras espécies de polissacarídeos hidrolisados, a hidrólise ocorreu nas mesmas condições deste trabalho,

**Tabela 2.** Principais diferenças entre os métodos para matéria-prima de heparina sódica presentes na Farmacopeia Americana e no trabalho de Itoh et al.<sup>16</sup>.

Método de heparina sódica		
Diferenças	Farmacopeia americana USP39-NF34 <sup>14</sup>	Trabalho de Itoh et al. <sup>16</sup>
Coluna cromatográfica	Carbo Pac PA20	Carbo Pac PA1
Fase de eluição	Hidróxido de potássio 14 mM	Hidróxido de sódio 8 mM
Etapa de limpeza	Hidróxido de potássio 100 mM	60% de hidróxido de sódio 8 mM e 40% de acetato de sódio 1 mM



**Figura 1.** Resultado de cinco injeções de solução de adequação do sistema, onde o sinal em 7,75 min é referente a galactosamina e o sinal em 9,50 min referente a glicosamina.



Tabela 3. 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	Resultados obtidos para o método proposto	Observação
Resolução	≥ 2 entre os picos de galactosamina e glicosamina	3,01	Aprovado
Número de pratos teóricos	≥ 2.000 para o pico de glicosamina	3.754	Aprovado
Fator de assimetria	Entre 0,8 e 2,0 para os picos de galactosamina e glicosamina	1,13 e 1,10 para galactosamina e glicosamina, respectivamente	Aprovado

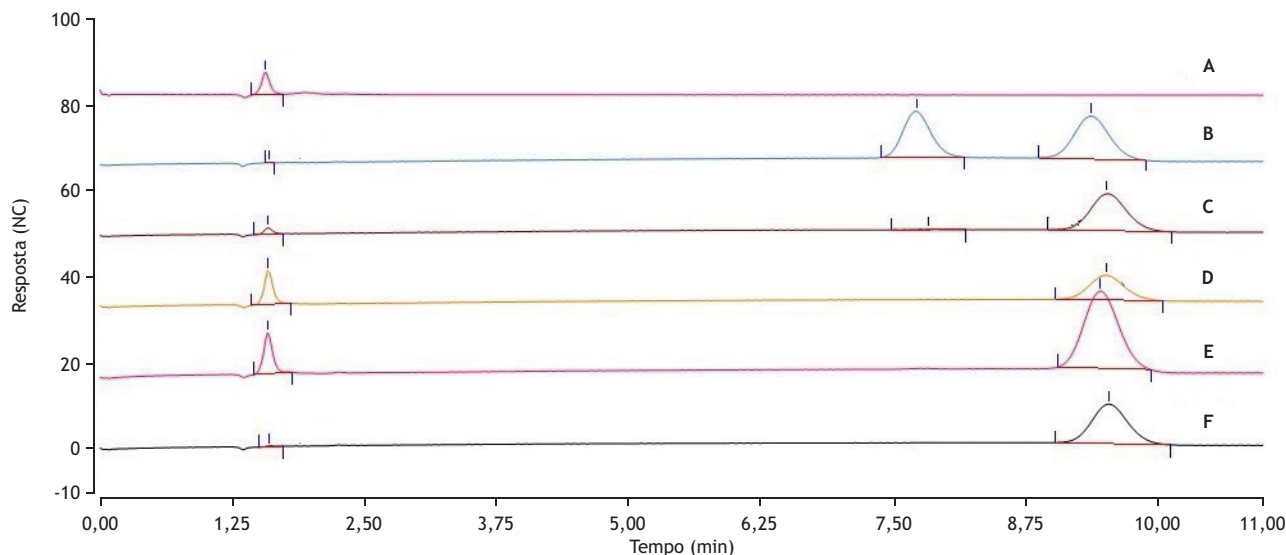


Figura 2. Comparação entre (A) Branco; (B) Solução de adequação do sistema; (C) Amostra 1; (D) Amostra 2; (E) Amostra 3; (F) Matéria-prima de heparina sódica suína.

por isso, a detecção de sinais próximos ao volume morto, como o visto em 1,60 min, pode incontestavelmente ser atribuída ao ácido clorídrico. O pico de glicosamina permanece no tempo de retenção de 9,5 min, aproximadamente, em todos os casos. Na amostra 1 foi detectado pico proveniente da 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 0,01 mg/mL.

Seguindo o critério de aceitação visto na Farmacopeia Americana USP39-NF34<sup>14</sup> de ≤ 1% de limite de galactosamina em hexosaminas totais, foi possível avaliar a amostra 1, na qual os resultados de cinco injeções foram tratados por teste de Grubbs ( $\alpha = 0,05$ ) e nenhum valor aberrante foi encontrado. Os dados usados nas Equações 4 e 5 foram os resultados da média das injeções, sendo assim,  $PGALACTOSAMINA/PGLICOSAMINA$  seria a razão entre a resposta de galactosamina e glicosamina na solução de adequação do sistema;  $PA_{GALACTOSAMINA}$  é a área do pico de galactosamina da solução de adequação do sistema;  $PM_{GALACTOSAMINA}$  é referente à massa de galactosamina da solução padrão;  $PM_{GLICOSAMINA}$  seria a massa de glicosamina da solução padrão;  $PA_{GLICOSAMINA}$  é a área do pico de glicosamina da solução de adequação do sistema;  $AA_{GALACTOSAMINA}$  é referente à área do pico de galactosamina da solução da amostra e, por fim,  $AA_{GLICOSAMINA}$  é igual à área do pico de glicosamina da solução da amostra.

$$PGALACTOSAMINA/PGLICOSAMINA = \left( \frac{PA_{GALACTOSAMINA}}{PM_{GALACTOSAMINA}} \right) \times \left( \frac{PM_{GLICOSAMINA}}{PA_{GLICOSAMINA}} \right) \quad \text{Equação 4}$$
$$\left( \frac{2,67}{0,8} \right) \times \left( \frac{3,17}{0,98} \right) = 3,38 \times 3,26 = 10,80$$

$$\text{Resultado} = \left\{ \left( \frac{AA_{GALACTOSAMINA}}{PA_{GALACTOSAMINA}} \right) / \left( \frac{AA_{GLICOSAMINA}}{PA_{GLICOSAMINA}} \right) + AAGLICOSAMINA \right\} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$
$$\left\{ \left( \frac{0,03}{10,80} \right) / \left( \frac{0,03}{10,80} \right) + 4,58 \right\} \times 100 = 0,06\%$$

Portanto, pelo cálculo, pode-se afirmar que a amostra possui teor de galactosamina dentro do limite aceitável. De acordo com os resultados promissores vistos neste trabalho e da importância de se desenvolver métodos de análise físico-química para a heparina na forma injetável, podemos sugerir que um dos caminhos para a implementação em compêndios oficiais seria a proposta adaptada do trabalho de Itoh et al.<sup>16</sup> para o produto acabado.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que o método cromatográfico proposto para análise físico-química de amostras de heparina suína injetável possui parâmetros de adequação do sistema dentro dos critérios de aceitação estabelecidos pela Farmacopeia Americana e a análise de três amostras de heparina sódica suína evidenciou a presença de galactosamina em apenas uma das apresentações, a qual obtinha teor abaixo do estabelecido pelo compêndio. Sendo considerado simples e econômico, o método será encaminhado para a Farmacopeia Brasileira como sugestão de monografia para o produto acabado.





## REFERÊNCIAS

1. Fonseca EP. Novos rumos para a pesquisa em vigilância sanitária no Brasil. *Vigil Sanit Debate*. 2013;1(2):22-6.
2. Gemal AL, Teixeira CRRR, Carmo EH, Vital NC. (In) Definições sobre o componente laboratorial de vigilância sanitária no Brasil. *Vigil Sanit Debate*. 2016;4(4):5-12. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.00772>
3. Rabenstein DL. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep*. 2002;19:312-31. <https://doi.org/10.1039/B100916H>
4. Cavalheiro Filho C, Chamone DAF, Rached RA, Maffei FH. Heparinas: momento atual. *Rev Assoc Med Bras*. 2008;54(6):471-86. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302008000600001>
5. Kemsley, J. Tainted heparin's link to reactions. *Chem Eng News*. 2008[acesso 19 jul 2017];86(49):9. Disponível em: <http://cen.acs.org/articles/86/i49/Tainted-Heparins-Link-Reactions.html>
6. Keire DA, Trehy ML, Reepmeyer JC, Kolinski RE, Ye W, Dunn J et al. Analysis of crude heparin by <sup>1</sup>H NMR, capillary electrophoresis, and strong-anion-exchange-HPLC for contamination by over sulfated chondroitin sulfate. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;51(4):921-6. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.10.017>
7. Guerrini M, Beccati D, Shriver Z, Naggi AM, Bisio A, Capila I et al. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nat Biotechnol*. 2008;26(6):669-75. <https://doi.org/10.1038/nbt1407>
8. Rosenfeld L, Prior MT, Girardi LM. Comparison of the separation of bovine heparin by strong anion exchange and by gel filtration chromatography. *Thromb Res*. 1991;64(2):203-11. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(91\)90119-H](https://doi.org/10.1016/0049-3848(91)90119-H)
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Heparina da Baxter retirada nos Estados Unidos não foi comercializada no Brasil: o medicamento foi retirado por estar relacionado a reações alérgicas. Informe SNVS/Anvisa/GFARM nº 2, de 19 de fevereiro de 2008[acesso 19 abr 2018]; Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p\\_id=101&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&\\_101\\_struts\\_action=%2Fasset\\_publisher%2Fview\\_content&\\_101\\_assetEntryId=401931&\\_101\\_type=content&\\_101\\_groupId=33868&\\_101\\_urlTitle=informe-snvs-anvisa-gfarm-n-2-de-19-de-fevereiro-de-2008&inheritRedirect=true](http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=401931&_101_type=content&_101_groupId=33868&_101_urlTitle=informe-snvs-anvisa-gfarm-n-2-de-19-de-fevereiro-de-2008&inheritRedirect=true)
10. Heparina cálcica: heparinum calcium. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. *Farmacopeia brasileira*. 5a ed. Brasília, DF: Anvisa; 2010. v. 2, p. 1017-22.
11. Heparina sódica: heparinum natricum. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. *Farmacopeia brasileira*. 5a ed. Brasília, DF: Anvisa; 2010. v. 2, p. 1022-27.
12. Heparina cálcica: heparinum calcium. In: Council of Europa. *European pharmacopoeia: suplemente 8.5*. 8a ed. Strasbourg: Council of Europe; 2016. p. 4339-40.
13. Heparina sódica: heparinum natricum. In: Council of Europa. *European pharmacopoeia: suplemente 8.5*. 8. ed. Strasbourg: Council of Europe; 2016. p. 4341-3.
14. Heparin sodium. In: U.S. Pharmacopeia. *The United States Pharmacopeia 39*. National Formulary 34. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeia; 2016. v. 2, p. 4188-93.
15. Heparin sodium injection. In: U.S. Pharmacopeia. *The United States Pharmacopeia 39*. National Formulary 34. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeia; 2016. v.2, p. 4188-93.
16. Itoh S, Hiruta Y, Hashii N, Fujita N, Natsuga T, Hattori T et al. Determination of galactosamine impurities in heparin sodium using fluorescent labeling and conventional high-performance liquid chromatography. *Biologicals*. 2013;41(6):355-63. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.06.002>
17. Lanças FM. *Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE*. Campinas: Átomo; 2009.
18. Pallastrelli MB. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos enantiosseletivos para separação e determinação do esmolol e sotalol [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2013.
19. Thermo Fisher Scientific. *Dionex™ CarboPac™ PA20 Carbohydrate Column*. 2017[acesso 19 jul 2017]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/060142>
20. Thermo Fisher Scientific. *Dionex™ CarboPac™ PA1 Carbohydrate Column*. 2017[acesso 19 jul 2017]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/057178>
21. Hurum D, Rohrer J. Determination of galactosamine-containing organic impurities in heparin by HPAE-PAD. *Application Note*. 2016;233.
22. Restaino OF, Finamore R, Diana P, Marseglia M, Vitiello M, Casillo A et al. A multi-analytical approach to better assess the keratan sulfate contamination in animal origin chondroitin sulfate. *Anal Chim Acta*. 2017;958:59-70.

## Agradecimentos

À estrutura cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Ao auxílio financeiro proporcionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

## Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.  
Para ver uma cópia desta licença, visite [http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt\\_BR](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR).