

## Um método robusto para quantificação de contaminantes de baixa massa molecular em heparina: detecção do tris(2-n-butoxietil)fosfato

Daniel S. Riter<sup>1</sup> (IC)\*, Arquimedes P. S. Filho<sup>1</sup> (PG), Lauro M. Souza<sup>1</sup> (PG), Thales R. Cipriani<sup>1</sup> (PQ), Marco Guerrini<sup>2</sup> (PQ), Giangiacomo Torri<sup>2</sup> (PQ), Marcelo A. Lima<sup>3</sup> (PG), Helena B. Nader<sup>3</sup> (PQ), Philip A. J. Gorin<sup>1</sup> (PQ), Marcello Iacomini<sup>1</sup> (PQ), Guilherme L. Sasaki<sup>1</sup> (PQ) \*[danielriter@ufpr.br](mailto:danielriter@ufpr.br)

<sup>1</sup>Laboratório de Química de Carboidratos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, CEP: 81531-980;

<sup>2</sup>Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche G. Ronzoni, Milão – Itália, CEP: 20133;

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo – SP, CEP: 04044020.

Palavras Chave: contaminante, heparina, PCA, RMN

### Introdução

A heparina é um polissacarídeo sulfatado pertencente à família dos glicosaminoglicanos (GAG) com inúmeras atividades biológicas associadas à interações com várias proteínas. No ano de 2008, vários casos de efeitos adversos utilizando este polissacarídeo na diálise foram relatados, com centenas de óbitos nos EUA, Europa e Ásia, originando a crise mundial da heparina. Guerrini e colaboradores, através de análises de ressonância magnética nuclear (RMN), identificaram que as amostras de heparina estavam contaminadas com uma condroitina sulfato oversulfatada (OSCS)<sup>1</sup>. Esses acontecimentos, relacionados à contaminação, podem ser o resultado do aumento na demanda mundial de heparina, sendo que aproximadamente, em 2008, foram causadas cerca de 250 mortes por complicações no uso do medicamento na Europa e EUA<sup>1</sup>. Para a análise dos componentes de baixa massa molecular são realizados ensaios qualitativos e a dosagem de solventes residuais é feita por GLC (USP 467 Residual Solvent Method), que despende grande tempo. Com isso, este trabalho objetiva a análise quantitativa de solventes residuais e contaminantes de baixa massa molecular presentes em amostras de heparina, uma vez que o ensaio de contaminação por GAGs, e especialmente o OSCS, é realizado por RMN.

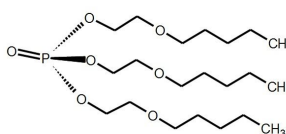
### Resultados e Discussão

Para a análise por RMN, amostras de heparina pura foram dissolvidas em solvente deuterado e acrescentados os contaminantes acetato, álcool benzílico, fenol, etanol e metanol, variando a concentração de 0,0155% a 2% (p/p). As análises de RMN foram realizadas em um equipamento Bruker Avance III 400 MHz, com sonda inversa de 5 mm e gradiente de campo. Na Tabela 1 estão expostos os resultados das áreas integradas dos contaminantes em relação à área do hidrogênio anomérico (H-1). As regiões selecionadas para a integração das áreas foram as seguintes:  $\delta$  1.1 - 1.3 ppm (EtOH);  $\delta$  1.85 - 1.95 ppm (AcO<sup>-</sup>);  $\delta$  3.35 - 3.4 ppm (MeOH);  $\delta$  5.1 - 5.6 ppm (região de <sup>1</sup>H);  $\delta$  6.9 - 7.35 ppm (PhOH) e  $\delta$  7.4 - 7.5 ppm (BzOH).

**Tabela 1.** Relação entre os valores das áreas integradas das diferentes concentrações de contaminantes com a área do hidrogênio anomérico da heparina

Contam.	2%	1%	0,5%	0,3%	0,1%	0,06%	0,01%
Acetato	0,113	0,053	0,032	0,017	0,010	0,006	0,002
Benzol	0,213	0,095	0,056	0,028	0,017	0,007	0,002
Fenol	0,245	0,107	0,064	0,032	0,018	0,008	0,002
Etanol	0,303	0,134	0,075	0,041	0,024	0,012	0,021
Metanol	0,435	0,208	0,144	0,091	0,052	0,047	0,030

As amostras de heparina foram então particionadas, sendo isolado o produto da fase orgânica (80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e evaporado sob baixa pressão. O resíduo resultante foi submetido à estudos detalhados de RMN utilizando correlação homonuclear (COSY e TOCSY) e heteronuclear (HSQC editado e HMBC <sup>1</sup>H; <sup>13</sup>C - <sup>1</sup>H; <sup>31</sup>P). Os resultados sugeriram que o contaminante fosse um éster organofosforado, sendo confirmada a estrutura do mesmo por análise em espectrômetro de massas (ESI-MS), definindo a estrutura do mesmo como mostrado na figura 1.



**Fig. 1** – Estrutura do organofosforado tris(2-n-butoxietil) fosfato (TBEP)

### Conclusões

O trabalho conseguiu prover, em um simples espectro de <sup>1</sup>H-RMN de heparina, a quantificação de solventes residuais, bem como de contaminantes de baixa massa molecular não-voláteis. Além disso, um novo contaminante foi identificado em heparinas comerciais, o TBEP, podendo causar riscos potenciais à saúde, incluindo sinais de hemangiosarcoma.

### Agradecimentos

Capes, CNPQ, Fundação Araucária

<sup>1</sup>Guerrini, M.; Beccati, D.; Shriver, Z.; Naggi, A.; Viswanathan, K.; Bisio, A.; Capila, I.; Lansing, J. C.; Guglieri, S.; Fraser, B.; Al-Hakim, A.; Gunay, N. S.; Zhang, Z.; Robinson, L.; Buhse, L.; Nasr, M.; Woodcock, J.; Langer, R.; Venkataraman, G.; Linhardt, R. J.; Casu, B.; Torri, G.; Sasisekharan, R. *Nat. Biotechnol.*, 2008, 26, 669-675.