

# Avaliação da potência de heparinas não fracionadas comercializadas no Brasil por meio de testes cromogênicos anti-fator Xa e anti-fator IIa e ensaio de coagulação

## Potency evaluation of unfractionated heparins commercialized in Brazil through anti-factor Xa and anti-factor IIa chromogenic tests and coagulation assay

Renata Jurema Medeiros<sup>1</sup> 

Nathália Pessoa Gonçalves<sup>1</sup> 

Magno Maciel-Magalhães<sup>1,\*</sup> 

João Ferreira Martins<sup>1</sup> 

Tiago Savignon Cardoso

Machado<sup>II</sup> 

### RESUMO

**Introdução:** A heparina é um fármaco que apresenta atividade anticoagulante, ligando-se à antitrombina e acelerando a taxa de inibição de diversas proteases envolvidas no processo de coagulação. Na década de 2000, o mercado mundial enfrentou um período conturbado em relação às heparinas após relatos de reações alérgicas e de mortes causadas pelo seu uso, o que exigiu um controle de qualidade mais rigoroso. **Objetivo:** Realizar o controle de qualidade das heparinas sódicas não fracionadas de origem suína comercializadas no Brasil e da matéria-prima heparina em base seca, tanto de origem suína quanto bovina, por meio de ensaios de potência. **Método:** Foram analisadas 64 amostras do produto final (comercializado), sendo 39 da marca A e 25 da marca B, e seis amostras de matérias-primas. As amostras foram testadas por antifator Xa e antifator IIa, de acordo com a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP), e por teste de coagulação, descrito na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (BP). **Resultados:** Quarenta amostras de heparina foram aprovadas em todos os ensaios de potência e 24 amostras não foram aprovadas, sendo 23 da marca A e uma da marca B. Todas as amostras de matérias-primas de origem suína foram consideradas aprovadas, enquanto as três de origem bovina apresentaram menor potência. **Conclusões:** Quase todas as amostras não aprovadas apresentaram potência acima de 110%, o que pode representar risco de sangramento para os pacientes. Assim, é necessário monitorar o controle de qualidade das heparinas e avaliar a condição clínica dos pacientes em uso para identificar e reduzir os riscos e salvar a saúde pública.

**PALAVRAS-CHAVE:** Heparina; Ensaio Antifator Xa; Ensaio Antifator IIa; Controle de Qualidade; Saúde Humana

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

<sup>II</sup> Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\* E-mail: magno.magalhaes@fiocruz.br

Recebido: 12 maio 2021

Aprovado: 13 fev 2023

**Como citar:** Medeiros RJ, Gonçalves NP, Maciel-Magalhães M, Martins JF, Machado TSC. Avaliação da potência de heparinas não fracionadas comercializadas no Brasil através de ensaio cromogênico e de coagulação anti-fator Xa e anti-fator IIa. *Vigil Sanit Debate*, Rio de Janeiro, 2023, v.11: e01923. <https://doi.org/10.22239/2317-269X.01923>

### ABSTRACT

**Introduction:** Heparin is a drug that has anticoagulant activity, binding to antithrombin and accelerating the rate of inhibition of several proteases involved in the coagulation process. In the 2000s, the world market faced a troubled period regarding heparins after reports of allergic reactions and deaths caused by its use, requiring more rigorous quality control. **Objective:** The main goal of this work was to perform quality control of unfractionated sodium heparins of porcine origin commercialized in Brazil and heparina raw material on a dry basis, of both porcine and bovine origin, through potency assays. **Methods:** Sixty-four samples of the final product (commercialized) were analyzed: 39 of brand A and 25 of brand B, and six samples of raw materials. Samples were assayed through anti-factor Xa and anti-factor IIa, according to United States Pharmacopeia (USP), and coagulation assay, described in the 5th edition of Brazilian Pharmacopeia (BP).



**Results:** In the present study, 40 heparin samples were approved in all potency assays, while 24 samples were non-approved, 23 of brand A and one of brand B. All samples of porcine-origin raw materials were considered approved, while the three of bovine origin showed lower potency. **Conclusions:** Almost all non-approved samples presented potency above 110%, which may represent a bleeding risk for patients. Thus, it is necessary to monitor the quality control of heparins and assess the clinical condition of patients undergoing their use to identify and reduce risks and Safeguard public health.

**KEYWORDS:** Heparin; Anti-factor Xa Assay; Anti-factor IIa Assay; Quality Control; Human Health

## INTRODUÇÃO

A heparina é o mais antigo anticoagulante utilizado na prática médica, com grande importância na clínica, e está presente na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS). Estruturalmente, são glicosaminoglicanos sulfatados de peso molecular variável, compostos por unidades de glucosamina e ácido hexurônico, que se alternam por meio de ligações glicosídicas. O polímero tem grande heterogeneidade estrutural devido à sulfatação e acetilação variáveis, bem como à distribuição das unidades de ácido hialurônico<sup>1,2,3,4</sup>.

A principal ação é a prevenção da coagulação sanguínea em vários procedimentos de risco, como enterotomia e transplante de órgãos, trombose venosa profunda ou trombose cardíaca que se desenvolve como resultado da deterioração da circulação sanguínea<sup>4,5,6</sup>. Estima-se que cerca de 20 milhões de pacientes em todo o mundo a utilizem para tratamento e profilaxia de trombose venosa ou arterial. A heparina também tem outras funções biológicas, como propriedades anti-inflamatórias, antitrombóticas, anti-hiperlipidêmicas e antiarterioscleróticas, além de funções anticoagulantes que inibem a atividade da trombina<sup>3,4,7</sup>.

Essa substância pode ser encontrada em vários tecidos animais, como pulmão, fígado, sangue e tecidos intestinais de animais superiores, especialmente nos mastócitos. Para ser usada como medicamento, a heparina é extraída da mucosa intestinal suína ou do pulmão bovino como subprodutos do processo de produção de carne e transformada em sal de cálcio ou sódio por meio de tratamento enzimático e químico<sup>3,4,5</sup>. A Farmacopeia Brasileira (BP) considera as heparinas provenientes da mucosa suína ou bovina como ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) distintos<sup>5,6,8,9</sup>.

Durante o processo de isolamento e extração, ocorre a degradação parcial de suas cadeias de glicosaminoglicanos, produzindo uma formulação formada por fragmentos de pesos moleculares heterogêneos, variando de 3.000 a 30.000 Da, conhecidos como heparina não fracionada, heparina convencional ou simplesmente heparina<sup>4,5</sup>. As heparinas de baixo peso molecular são frações de heparina não fracionada produzidas pela despolimerização controlada de suas cadeias de polissacarídeos, seja quimicamente ou por uma reação enzimática. Nesse processo, o peso molecular do produto final é reduzido a uma média de 4.000 a 6.000 Da<sup>4</sup>.

As respostas terapêuticas à heparina são muito variáveis entre os indivíduos. Portanto, é essencial monitorar sua eficácia e

segurança para o paciente por meio de ensaios laboratoriais, como o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT), usado para avaliar todos os fatores de coagulação, exceto as plaquetas, determinando o tempo necessário para formar um trombo de fibrina em uma amostra de plasma<sup>10</sup>.

Devido ao risco de causar danos significativos aos pacientes por falhas no processo de uso, Niccolai et al.<sup>11</sup> chamaram a atenção para a associação da heparina não fracionada (HNF) com um alto índice de problemas relacionados às suas propriedades farmacológicas inerentes ou frequentemente causados por erros de medicação. Eles também alertaram para o fato de que o *Institute for Safe Medication Practices* classificou a HNF como um medicamento de alto risco. Em 2008, o *Institute for Healthcare Improvement* (IHI) classificou a HNF como uma das dez categorias de medicamentos de alto risco ou potencialmente perigosos. O IHI também informou que esses medicamentos estavam relacionados à maioria dos eventos adversos em um ambiente hospitalar<sup>12</sup>.

Bezerra e Silva<sup>13</sup> também evidenciaram esse fato em 2008, após analisar 100 notificações de eventos adversos em um hospital sentinela na região Centro-Oeste do Brasil. Os autores observaram que a heparina sódica e outros anticoagulantes aparecem como um dos medicamentos mais frequentemente envolvidos em eventos adversos, variando de 3,0 a 5,7% de todos os eventos adversos relacionados a medicamentos. Junqueira et al.<sup>14</sup> observaram em um estudo realizado em 2011 que 5,0 a 10,0% dos pacientes em uso de HNF apresentam algum sangramento, como hematúria, sangramento gastrointestinal superior, hemoptise, epístaxe, hematomas e melenas. A principal preocupação são os eventos hemorrágicos causados pelo uso da heparina, que variam em grau de risco de acordo com o local e o volume de sangue envolvido, levando à instabilidade hemodinâmica, ventilação, hospitalização e mortalidade<sup>10</sup>.

A Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19), causada pelo Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2), espalhou-se rapidamente pelo mundo em uma alta taxa de transmissão. A COVID-19 grave é marcada por complicações trombóticas associadas à falência de múltiplos órgãos e ao aumento da mortalidade. A aplicação de heparinas não fracionadas e de baixo peso molecular como drogas anticoagulantes reduziu significativamente a gravidade da doença e a mortalidade induzida pela COVID-19, pois a heparina é um agente multifuncional<sup>15</sup>. Esse medicamento é recomendado por consenso de especialistas



para pacientes com COVID-19 grave. Eles ainda ressaltam que, embora a heparina possa ser benéfica no tratamento da coagulopatia na COVID-19 (ou seja, efeitos antivirais e anti-inflamatórios diretos), o equilíbrio entre seus benefícios e riscos deve ser considerado. O controle de qualidade da potência desse medicamento é de grande importância para o sucesso do tratamento e a preservação da vida do paciente<sup>16,17,18</sup>.

Outra fonte de preocupação com relação à qualidade das heparinas comerciais é a possibilidade de adulteração fraudulenta de sua composição com substâncias como o sulfato de condroitina supersulfatado. Em 2008, o mercado mundial enfrentou um período conturbado em relação à confiabilidade e à qualidade da heparina<sup>19</sup>. Episódios relatados nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa identificaram lotes de heparina não fracionada contaminados com sulfato de condroitina supersulfatado, resultando na morte de centenas de pacientes<sup>20,21</sup>. Para monitorar a qualidade das heparinas comercializadas nos EUA, a *United States Pharmacopeia* (USP) publicou em 2019 a metodologia analítica para o controle de qualidade da potência, identificação e pureza desse medicamento na 42 - NF 37 *The USP and National Formulary*<sup>22</sup>.

Um episódio marcante ocorreu no Brasil após a interrupção da comercialização da heparina específica amplamente utilizada nos serviços de cirurgia cardiovascular para uso intravenoso do Laboratório Roche (Liquemine®). As demais marcas disponíveis no mercado causaram complicações e aumentaram as taxas de reoperação por sangramento após cirurgias cardíacas registradas pela Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular (SBCCV)<sup>3,14</sup>.

Depois de 2008, as farmacopeias internacionais iniciaram uma revisão das monografias de heparina, e métodos analíticos para a detecção de contaminantes foram introduzidos na lista de ensaios de controle de qualidade obrigatórios. Metodologias como a eletroforese capilar e a ressonância magnética nuclear foram desenvolvidas para detectar impurezas e espécies contaminantes e foram publicadas nesses documentos. Os ensaios de impureza tiveram seus limites reduzidos para controlar a polidispersidade da heparina por meio da análise do peso molecular<sup>21,23</sup>.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) conduziu um projeto para revisar as monografias de heparina cálcica e sódica da BP. De acordo com essas novas diretrizes, os laboratórios que produziam heparina sódica injetável no Brasil analisaram obrigatoriamente seus produtos, e não foi detectada nenhuma contaminação por sulfato de condroitina supersulfatado. No entanto, também foi observado dermatan sulfato, um composto provavelmente sem efeito tóxico, mas que demonstra um controle de qualidade deficiente. As amostras também estavam quimicamente degradadas e com uma mudança significativa no peso molecular. Uma diferença nos valores de potência entre a HNF de origem bovina e a de origem suína também foi calculada e mostrou uma atividade anticoagulante significativamente reduzida. Os autores alertaram que essa diminuição da atividade anticoagulante pode ser responsável pela coagulopatia de consumo durante a circulação

extracorpórea (CEC) e pode ser erroneamente traduzida por um quadro clínico de discrasia sanguínea<sup>24</sup>.

Na 5ª edição da BP, esses ensaios para detectar impurezas e espécies contaminantes, usando a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, capaz de identificar contaminantes como o dermatan sulfato, foram publicados nas monografias de matérias-primas de heparina de cálcio e de sódio. Além disso, ensaios de atividade antifator IIa (anti-FIIa) e de atividade anticoagulante para determinação da potência também foram publicados para o controle de qualidade das matérias-primas<sup>25</sup>. Em 2016, o Primeiro Suplemento da Farmacopeia Brasileira 5ª edição foi finalmente aprovado. Atualmente, as metodologias para análises de controle de qualidade de heparina sódica e soluções injetáveis de cálcio são o ensaio de atividade anti-FIIa para heparina sódica e os ensaios de atividade antifator Xa (anti-FXa) e atividade anti-FIIa para heparinas de baixo peso molecular. Ambos têm valores específicos para os diferentes tipos de heparina de baixo peso molecular: enoxaparina, tinzaparina, dalteparina e nadroparina<sup>26,27</sup>.

O presente estudo teve como principal objetivo analisar, durante dois anos, de fevereiro de 2014 a março de 2016, a potência de heparinas sódicas não fracionadas de origem suína de diferentes marcas comercializadas no Brasil e de matérias-primas em base seca de origem suína e bovina, utilizando ensaios cromogênicos descritos na USP e BP. As amostras de heparina foram coletadas como parte de um estudo da Anvisa para controle de qualidade desses medicamentos<sup>25,26</sup>. Os resultados foram comparados com o ensaio de coagulação descrito no PB, usando o 6º Padrão Internacional de Heparina da OMS como referência.

## MÉTODO

### Amostragem

Durante um período de dois anos, entre fevereiro de 2014 e março de 2016, o Laboratório de Fisiologia do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) recebeu 70 amostras de heparinas: 64 amostras da forma farmacêutica de solução injetável de heparinas sódicas não fracionadas de origem suína com frasco de 5.000 UI/mL ou ampola de 5.000 UI/0,25 mL de duas marcas nacionais. Trinta e nove pertenciam à marca A e 25 amostras pertenciam à marca B. Outras seis amostras de material de heparina bruta em uma base seca de material de origem suína e bovina.

### Ensaio cromogênicos de atividade anti-FXa e anti-FIIa

#### Preparação da amostra

As amostras de produtos acabados foram diluídas com solução tampão tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) (0,050 M Tris, 0,0075 M ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA), 0,175 M NaCl, 1% polietilenoglicol 6000 [PEG 6000]) em pH 8,4. Foi obtida uma concentração de 20 UI/mL. Posteriormente, foi diluída para uma concentração de 2 UI/mL e, em seguida, diluída para as



concentrações do ensaio usando uma balança de precisão digital (Edutec, EEQ9003F-B, Brasil). Um mg de matéria-prima foi pesado e, em seguida, reconstituído com 1 mL de água deionizada, estimando uma concentração de 180 UI/mg, que é a potência mínima estabelecida na PB por mg em uma base seca. Depois disso, foram diluídos para 20 UI/mL, seguindo o mesmo procedimento descrito para os produtos acabados.

#### *Preparação padrão*

O 6º Padrão Internacional da OMS para heparina não fracionada do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC), código: 07/328 (aqui neste artigo chamado apenas de “padrão”) foi usado. Essa preparação tinha uma concentração certificada de 2.145 UI/ampola. Para a preparação padrão, uma ampola foi reconstituída em 100 mL de água deionizada e alíquotada em tubos com 1 mL em uma concentração final de 21,45 UI/mL. Para o ensaio, as alíquotas foram diluídas em solução tampão Tris pH 8,4 (0,050 M Tris, 0,0075 M EDTA, 0,175 M NaCl, 1% PEG 6000) para obter uma concentração de 2 UI/mL e, posteriormente, obter as concentrações usadas nos ensaios.

#### *Ensaio de atividade anti-FXa*

Para o ensaio de atividade anti-FXa, foi usada uma microplaca de 96 poços, pré-aquecida a 37°C por 15 minutos em uma incubadora de microplacas (Thermo Shaker, Agimaxx) com 30 µL da solução padrão em quatro concentrações (0,02, 0,04, 0,07 e 0,10 UI/mL, selecionadas com base na região linear) e 30 µL de amostras em duplicata para estabelecer uma curva de dose-resposta. Foram adicionados 30 µL de antitrombina 1 UI/mL (Anti-thrombin III 1.5 mg, HYPHEN BioMed) e agitados suavemente por 2 minutos a 37°C para que a heparina e a antitrombina pudessem se ligar. Após o período de incubação, foram adicionados 60 µL de FXa 10 nKat (Bovine Xa factor, HYPHEN BioMed) e, mais uma vez, agitou-se suavemente a 37°C por 2 minutos. Por fim, foram adicionados 60 µL de substrato cromogênico específico para FXa 1,30 mM (S-2222 25 mg, Chromogenix), incubados a 37 °C e agitados suavemente por mais 5 minutos. A reação foi interrompida com 30 µL de solução de ácido acético a 20%. A absorbância foi obtida em um leitor de microplacas (BioTek, Epoch) em um ponto final de 405 nm.

#### *Ensaio de atividade anti-FIIa*

Foi usada uma microplaca de 96 poços, pré-aquecida a 37°C por 15 minutos em uma incubadora de microplacas (Thermo Shaker, Agimaxx). Cinquenta µL de quatro concentrações padrão (0,003, 0,005, 0,010 e 0,020 UI/mL selecionadas com base na região linear) e 50 µL da amostra nas mesmas concentrações foram duplicados para estabelecer uma curva de dose-resposta. A microplaca foi então incubada a 37°C e agitada suavemente por 2 minutos com 100 µL de antitrombina 0,125 UI/mL (Anti-thrombin III 1,5 mg, HYPHEN BioMed) para que a heparina e a antitrombina pudessem se ligar. Em seguida, foram adicionados 25 µL de trombina 5 UI/mL (Thrombin, Sigma Aldrich), incubados a 37°C e agitados suavemente por dois minutos. Por fim, foram adicionados 50 µL de substrato cromogênico específico para FIIa 1,25 mM (S-2238 25 mg, Chromogenix), incubados a 37°C e agitados

suavemente por 5 minutos. A reação foi interrompida com 50 µL de solução de ácido acético a 20%. A absorbância foi obtida em um leitor de microplacas (BioTek, Epoch) a 405 nm.

#### **Ensaio de coagulação (Tempo de tromboplastina parcialmente ativada - aPTT)**

##### *Preparação da amostra*

As amostras de produto acabado foram diluídas com solução salina (NaCl 0,9%) para obter uma concentração de 20 UI/mL, que foi posteriormente diluída em concentrações de 0,8, 0,92 e 1,05 UI/mL, selecionadas com base na região linear. Para a matéria-prima, 1 mg foi pesado em uma balança digital de precisão (Edutec, EEQ9003F-B, Brasil) e depois reconstituído com 1 mL de água deionizada, com uma concentração estimada de 180 UI/mg. Depois disso, foram diluídos seguindo o mesmo procedimento descrito para os produtos acabados.

##### *Preparação padrão*

Foi usado o mesmo padrão descrito anteriormente. Para realizar o ensaio de coagulação, as alíquotas com concentração de 21,45 UI/mL foram diluídas com solução salina (NaCl 0,9%) para concentrações de 0,8, 0,92 e 1,05 UI/mL.

##### *Procedimento de ensaio*

Para o ensaio de coagulação, foi usado um coagulômetro (Stago, STart®) para incubação a 37°C e contagem de tempo de coagulação. Foram realizados três ensaios independentes, cada um em duplicata. Para cada ensaio, 50 µL de plasma de carneiro (obtido da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil) e 50 µL de heparina (padrão ou amostra) foram agitados suavemente e incubados a 37°C por 800 segundos. Depois disso, 50 µL de cefalina (Stago, CK PREST®) foram adicionados e incubados a 37°C por mais 2 minutos. Foram adicionados 50 µL de solução de CaCl<sub>2</sub> 0,025 M (Stago), e o tempo necessário para a coagulação foi monitorado. O tempo de recalcificação de controle foi medido no início e no final do procedimento, substituindo as diluições de heparina por uma solução salina (NaCl 0,9%).

#### **Análise estatística**

Os ensaios cromogênicos foram analisados usando linhas paralelas. Para cada série, a regressão da absorbância ou a alteração da absorbância por minuto foi calculada em relação às concentrações no logaritmo das soluções de amostra e padrão, e a potência da amostra foi calculada usando métodos estatísticos para ensaios de linha paralela. A potência da heparina de baixa massa molecular foi expressa em UI/mg. Um pacote estatístico validado, Combistats™ (referência EDQM: 0000061710, 2017), foi usado para realizar os cálculos. A linearidade, o paralelismo e a regressão foram analisados.

Para calcular os resultados, o valor de potência estimado do produto acabado em cada ensaio deve corresponder a 90% a 110% do valor de potência declarado. A potência da matéria-prima não deve ser inferior a 180 UI/mg em cada ensaio. Os limites



de confiança da potência estimada não devem ser inferiores a 80% e nem superiores a 125% do valor declarado ( $P = 0,95$ ). Um critério de aceitação de amostra é uma relação entre a atividade antifator Xa e a atividade antifator IIa entre 0,9 e 1,1. Os ensaios foram considerados válidos quando a linearidade e o paralelismo apresentaram  $p > 0,05$  e a regressão  $p < 0,05$ , respectivamente.

Os três ensaios de coagulação realizados para cada amostra foram calculados separadamente usando o modelo estatístico Parallel Lines e combinados usando o pacote estatístico Combistats™ (referência EDQM: 0000061710, 2017). A linearidade e a regressão também foram analisadas. Os ensaios foram válidos quando a linearidade e o paralelismo apresentaram  $p > 0,05$  e a regressão  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Determinação da potência de produtos acabados

Os valores do intervalo e das médias obtidas assim como os valores de desvio padrão do ensaio de coagulação (aPTT), dos ensaios de atividade cromogênica anti-FIIa e anti-FIXa e da razão de atividade anti-FIXa/anti-FIIa para a determinação da potência de produtos acabados de origem suína estão descritos na Tabela 1. Em relação aos ensaios cromogênicos de atividade anti-FIXa e anti-FIIa, 48 amostras foram aprovadas, o que significa que foram aprovadas individualmente em ambos os ensaios, com um limite de potência entre 90 e 110%, e apresentaram uma relação de atividade anti-FIXa/anti-FIIa entre 0,9 e 1,1. Um total de 16 amostras não foram aprovadas porque foram reprovadas em pelo menos um dos ensaios. O valor médio de potência para amostras não aprovadas no ensaio de atividade anti-FIXa e nos ensaios anti-FIIa foi de 117,92% e 127,34%, respectivamente. Em comparação, o valor médio de potência obtido para as amostras aprovadas no ensaio de atividade anti-FIXa e no ensaio de atividade anti-FIIa foi de 102,48% e 101,94%, respectivamente.

A distribuição da média e do desvio padrão dos valores obtidos durante a avaliação foi apresentada nas Figuras 1 e 2, comparando as marcas A e B. Sessenta e seis vírgula sessenta e sete por cento e 58,34% das amostras apresentaram valores superiores a 100% para a potência calculada no ensaio de atividade anti-FIXa e anti-FIIa, respectivamente, quando comparadas ao padrão.

Considerando as amostras não aprovadas, nove falharam em ambos os ensaios, com potência superior a 110%; seis amostras obtiveram valores superiores a 110% apenas no ensaio de atividade anti-FIIa, e apenas uma amostra obteve um valor inferior a 90% no ensaio de atividade anti-FIIa.

Comparando as amostras por marca (marca A e marca B), foi possível observar a superioridade de qualidade da marca B em relação à A. Em um total de 64 amostras analisadas, 39 pertenciam à marca A, sendo 24 aprovadas (62,00%) e 15 não aprovadas (38,00%), enquanto 25 amostras pertenciam à marca B, sendo 24 aprovadas (96,00%) e uma não aprovada (4,00%), conforme mostrado na Figura 3.

A determinação da potência estabelecida com um ensaio de coagulação (aPTT) demonstrou que, entre as 64 amostras

previamente analisadas por ensaios cromogênicos, 44 foram aprovadas, com valores de potência entre 90 e 110%. As outras 20 amostras foram consideradas não aprovadas. Noventa e nove por cento das amostras aprovadas tinham um valor de potência superior a 100%, e todas as amostras não aprovadas tinham um valor de potência superior a 110%. Os valores médios de potência das amostras aprovadas e não aprovadas foram 104,80% e 114,90%, respectivamente.

Comparando os resultados nesse ensaio das marcas A e B, foi possível observar que 20 amostras da marca A não foram aprovadas e 39 amostras foram aprovadas (51,00%), enquanto todas as 25 amostras da marca B foram aprovadas (Figura 4).

Em relação às 20 amostras consideradas não aprovadas no ensaio de coagulação (aPTT), oito também não foram aprovadas nos dois ensaios cromogênicos, quatro não foram aprovadas apenas na atividade anti-FIIa e oito não foram aprovadas apenas no ensaio de coagulação. Considerando as amostras de marcas, A e B juntas, 24 entre 64 amostras analisadas tiveram pelo menos um resultado negativo em um dos ensaios realizados (atividade anti-FIXa, atividade anti-FIIa ou ensaio de coagulação [aPTT]).

### Determinação da potência da matéria-prima da heparina

Foram analisadas seis amostras de matéria-prima de heparina, três de origem suína e três de origem bovina. Todas as três amostras de origem suína apresentaram pelo menos 180 UI/mg em um ensaio cromogênico, e o valor da razão de atividade anti-FIXa/anti-FIIa ficou entre 0,9 e 1,1; portanto, foram aprovadas. As três amostras de origem bovina apresentaram um valor de potência abaixo de 180 UI/mg em ambos os ensaios cromogênicos. As três amostras de origem suína também apresentaram um valor de potência entre 186 e 204 UI/mg nos ensaios de coagulação (aPTT). Em contraste, as amostras de origem bovina apresentaram um valor de potência entre 119 e 169 UI/mg (Tabela 2). Apesar de a razão de atividade anti-FIXa/anti-FIIa de duas amostras bovinas estar entre 0,9 e 1,1, esse único critério é insuficiente para considerar essas amostras aprovadas.

## DISCUSSÃO

Essa pesquisa demonstrou que 24 das 64 amostras de produtos acabados analisadas estavam não aprovadas, pelo menos em um dos ensaios descritos, totalizando 37,5% de amostras não aprovadas. Isso significa que as amostras de heparina ensaiadas não atendem aos valores descritos nas monografias da HNF sódica presentes na USP (USP 42 - a NF 37) e na 5ª edição da BP para os ensaios cromogênicos, além do ensaio de coagulação (aPTT). Esse último, descrito nesta pesquisa, foi realizado apenas para fins comparativos, pois, momentos antes da conclusão dos experimentos, foi retirado de ambas as farmacopeias devido à falta de correlação entre o tempo de coagulação ativado e a heparina plasmática<sup>28,29</sup>.

Como um produto heterogêneo altamente complexo, o comportamento farmacocinético da heparina foi estudado como uma alternativa às suas propriedades farmacodinâmicas. Os níveis de anti-FIXa e anti-FIIa no plasma, que expressam a potência em termos



**Tabela 1.** Valores da média, intervalo e desvio padrão dos ensaios de atividade cromogênica anti-FXa e anti-FIIa, razão de atividade anti-FXa/anti-FIIa e ensaio de coagulação para determinação da potência\* da heparina comercial coletada de 2014 a 2016 no Brasil (UI/mL).

Ensaio	Amostra	Ano de coleta das amostras			
		2014	2015	2016	
Anti-FIIa (UI/mL)	Média	5,364.904	5,786.39	5,912.67	
	Marca A	Faixa (± DP)	4605.28 - 6882.04 (567.48)	3938.96 - 6888.10 (884.01)	4961.18 - 8165.92 (1515.09)
	n	14	21	4	
	Marca B	Faixa (± DP)	4,909.28 - 5689.97 (321.29)	4,679.76 - 5,443.31 (297.10)	4,604.77 - 5,220.22 (231.47)
	n	4	16	5	
Anti-FXa (UI/mL)	Média	5,271.097	5,385.84	5,365.09	
	Marca A	Faixa (± DP)	4,839.66 - 6,556.61 (419.27)	4,769.34 - 6,042.15 (379.82)	5,126.38 - 5,699.65 (252.69)
	N	14	21	4	
	Marca B	Faixa (± DP)	5,001.99 - 5,429.78 (183.35)	4,652.73 - 5,461.13 (230.37)	4,959.71 - 5,378.27 (267.54)
	n	4	16	5	
Razão de atividade anti-FXa/ Anti-FIIa	Média	1	1	1.02	
	Marca A	Faixa (± DP)	0.912 - 1.064 (0.041)	0.886 - 1.100 (0.06)	0.944 - 1.063 (0.07)
	n	14	21	4	
	Marca B	Faixa (± DP)	0.970 - 1.050 (0.04)	0.945 - 1.100 (0.06)	0.950 - 1.030 (0.04)
	n	4	16	5	
Coagulação (aPTT) (UI/mL)	Média	5,461.75	5,700.31	5,540.96	
	Marca A	Faixa (± DP)	4,968.06 - 5,973.09 (336.72)	4,921.67 - 6704.6 (382.66)	5,246.95 - 5855.07 (258.47)
	n	14	21	4	
	Marca B	Faixa (± DP)	5,426.15 - 5,508.82 (38.13)	4,887.56 - 5,479.83 (177.06)	4,933.12 - 5,209.43 (111.44)
	n	4	16	5	

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

\*O valor da potência da heparina foi calculado a partir dos valores do ensaio de atividade antifator IIa e antifator Xa, do valor do ensaio de coagulação (aPTT) e da razão entre os valores do ensaio antifator Xa e antifator IIa.

Valores de referência da USP: Potência da heparina = 5.000 UI/mL, razão de atividade anti-FXa/FIIa = entre 0,9 e 1,1.

n: número de amostras analisadas; DP: desvio padrão; aPTT: tempo de tromboplastina parcial ativada.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

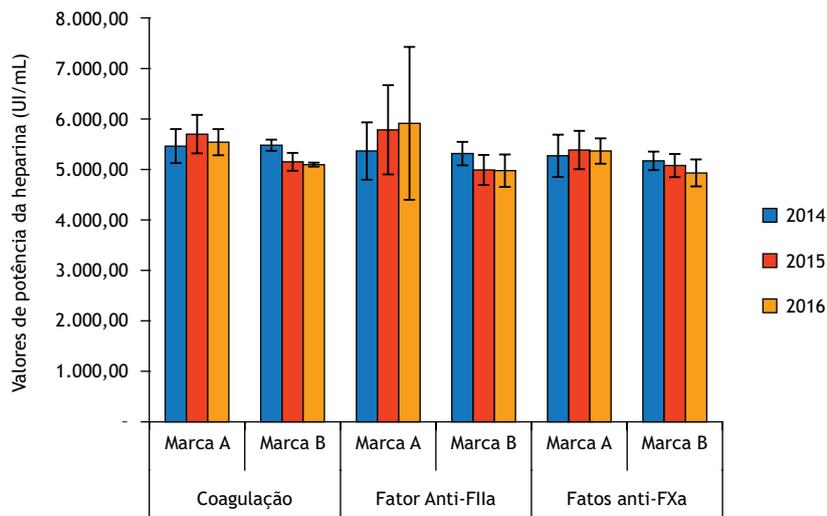
Valores de referência: Potência da heparina = 5.000 UI/mL. Para a marca A, n = 14, 21 e 4 em 2014, 2015 e 2016, respectivamente. Para a marca B, n = 4, 16 e 5 em 2014, 2015 e 2016, respectivamente.

de atividades antitrombina, podem quantificar o comportamento farmacocinético<sup>30,33</sup>. Os resultados descritos representam um risco potencial para os pacientes submetidos ao uso desse medicamento.

Um dado essencial obtido nesse estudo foi que quase todas as amostras não aprovadas obtiveram mais de 110% de potência em pelo menos um dos estudos. Estima-se que 5 a 10% dos pacientes em tratamento com HNF apresentem algum tipo de sangramento, como hematúria, sangramento gastrointestinal superior, hemoptise, epistaxe, equimose e hematomas. Eventos hemorrágicos, como as complicações decorrentes do uso de infusão contínua de heparina sódica, são preocupantes porque, dependendo do local ou órgão afetado e do volume de sangue envolvido,

podem aumentar a instabilidade hemodinâmica e a ventilação, aumentar a mortalidade, o tempo de internação hospitalar, além de exigir medidas de intervenção<sup>33</sup>. Assim, heparinas com potência superior à indicada podem potencializar esses efeitos, especialmente quando se trata de grupos de risco, incluindo idosos e pacientes com hipertensão ou insuficiência renal<sup>31,32</sup>.

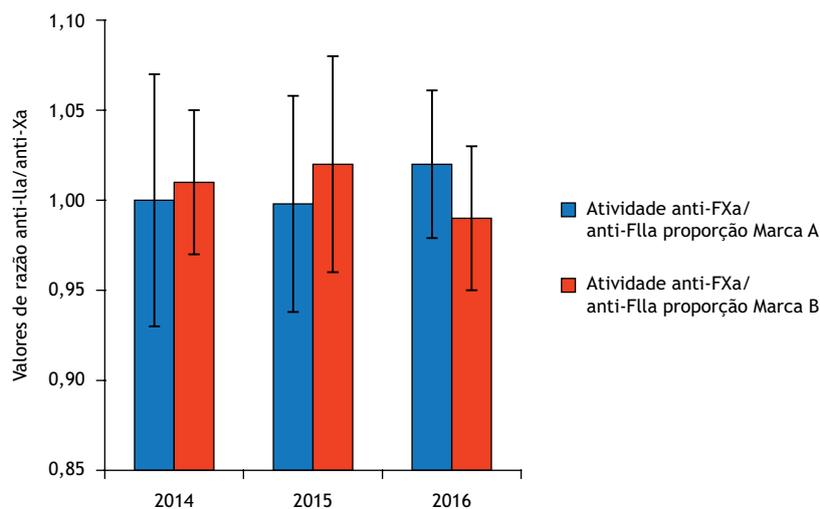
A pesquisa desenvolvida por Walenga et al.<sup>30</sup> analisou a enoxaparina, uma heparina de baixo peso molecular complexa e biologicamente derivada, de marca (Lovenox; Sanofi, EUA), em comparação com a enoxaparina genérica. A potência dos produtos determinada em sistemas bioquimicamente definidos foi semelhante no ensaio anti-FXa (valor IC50: 0,61 + 0,08 vs. 0,67



Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

Valores de referência: Potência da heparina = 5.000 UI/mL. Para a marca A, n = 14, 21 e 4 em 2014, 2015 e 2016, respectivamente. Para a marca B, n = 4, 16 e 5 em 2014, 2015 e 2016, respectivamente.

**Figura 1.** Distribuição dos valores de média e desvio padrão obtidos nos ensaios cromogênicos anti-FXa, atividade anti-FIIa e ensaios de coagulação para heparina comercial coletados de 2014 a 2016 no Brasil.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

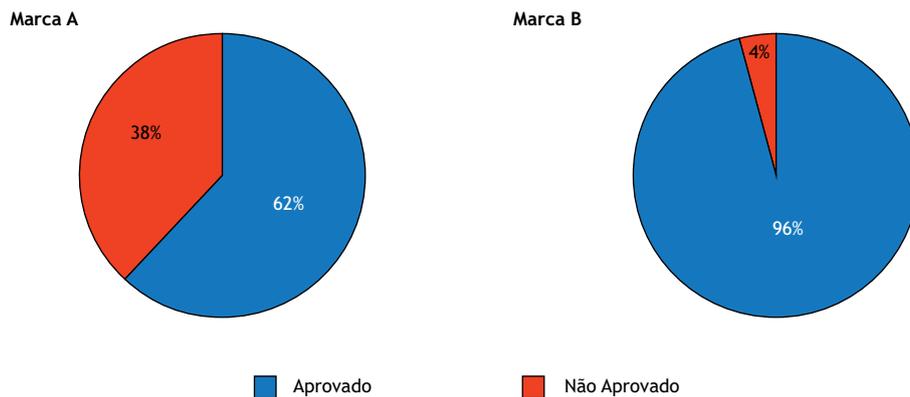
Valores de referência: razão de atividade anti-FXa/anti-FIIa = entre 0,9 e 1,1. Para a marca A, n = 14, 21 e 4 em 2014, 2015 e 2016, respectivamente. Para a marca B, n = 4, 16 e 5 em 2014, 2015 e 2016, respectivamente.

**Figura 2.** Distribuição das médias da razão de atividade anti-FXa/anti-FIIa e valores de desvio padrão obtidos de heparina comercial coletada de 2014 a 2016 no Brasil.

+ 0,11, para produtos de marca e genéricos, respectivamente) e no ensaio anti-FIIa (valor IC50 0,53 + 0,06 para o produto de marca e 0,62 + 0,10 para o produto genérico). Foi observada uma diferença significativa na fibrinocinética durante todo o período de formação do coágulo no efeito da enoxaparina de marca em comparação com a enoxaparina genérica. Essa diferença foi estável em todas as concentrações do medicamento e lotes de produtos testados. A enoxaparina de marca apresentou consistentemente um efeito anticoagulante mais potente, demonstrado pela formação mais lenta do coágulo com uma estrutura final de coágulo mais fraca.

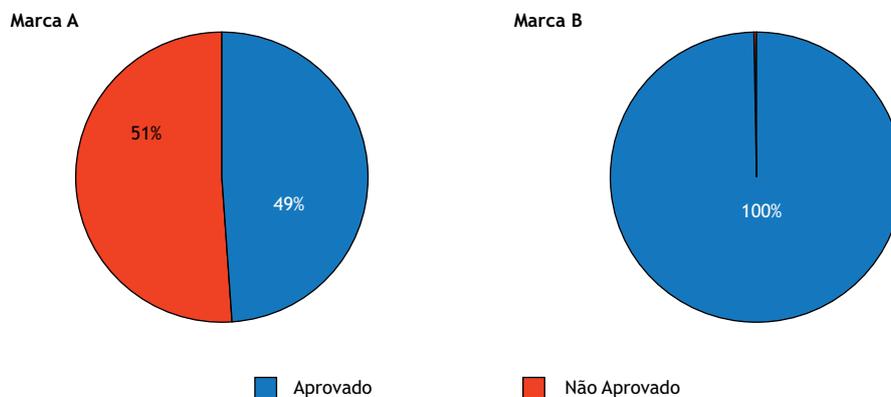
Tan e Cui<sup>33</sup> estudaram concentrações variáveis de Lovenox ou Enoxaparina genérica no teste de coagulação (aPTT). Os resultados do aPTT indicaram que os tempos de coagulação para ambas as enoxaparinas eram dependentes da concentração; quanto maior a concentração, maior o tempo de coagulação, e indicaram que não havia diferenças estatisticamente significativas.

Em outro estudo realizado em 2020, os ensaios anti-fator Xa e anti-fator IIa mostraram respostas inibitórias semelhantes com heparina derivada de baixo peso molecular. Todos os agentes produziram uma inibição dependente da concentração do fator



Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

Figura 3. Percentagem de aprovados e não aprovados em ensaios cromogênicos anti-FXa e anti-FIIa de heparina comercial coletada de 2014 a 2016 no Brasil, separada por marcas.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

Figura 4. Percentagem de ensaio de coagulação (aPTT) aprovado e não aprovado de heparina comercial coletada de 2014 a 2016 no Brasil, separada por marcas.

Tabela 2. Valores dos ensaios de atividade cromogênica anti-FXa e anti-FIIa e potência de coagulação para matérias-primas de heparina em base seca de origem suína e bovina coletadas de 2014 a 2016 no Brasil.

Origem		Atividade anti-FXa (UI/mg)	Atividade anti-FIIa (UI/mg)	Taxa de atividade anti-FXa/Anti-FIIa relação de atividade	Potência de coagulação (UI/mg)
Suínos	1	193.157	193.651	0.997	197.538
	2	181.886	182.325	0.998	186.908
	3	184.043	191.201	0.963	204.701
Bovinos	1	107.795	169.427	0.636	169.660
	2	85.320	81.088	1.052	119.755
	3	140.488	137.928	1.018	165.186

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

Xa e do fator IIa. O IC50 de todos os medicamentos no anti-Xa foi de 2,5 mg/mL. O IC50 foi muito maior nos ensaios anti-IIa, nos quais os lotes de Heparinox apresentaram um valor de 9,4 mg/mL e 9,6 mg/mL, enquanto o Lovenox apresentou um valor de 7,6 mg/mL. As proporções de anti-Xa e anti-IIa das heparinas de baixo peso molecular (LMWH) biossimilares e de marca foram comparáveis e ficaram na faixa de 3,1-3,4. Os resultados de aPTT das duas marcas analisadas foram semelhantes e dependentes da

concentração. A resposta do aPTT estava na faixa de 75-85 segundos na concentração de 10 mg/mL<sup>34</sup>.

A análise das matérias-primas mostrou que todas as amostras de HNF de origem suína foram aprovadas, de acordo com os limites da USP e da BP, ou seja, obtiveram pelo menos 180 UI/mg medidos em base seca. Além disso, os resultados obtidos nos três ensaios foram consistentes em pelo menos duas amostras. Com relação



aos de origem bovina, podemos observar que eles têm menor potência do que os de origem suína, conforme demonstrado na literatura<sup>14,20</sup>. Entretanto, o ensaio foi realizado com heparina suína padrão de origem não bovina. Portanto, não podemos classificá-las categoricamente como aprovadas ou não aprovadas.

## CONCLUSÕES

Neste trabalho, obtivemos uma visão geral dos valores de potência das heparinas sódicas não fracionadas comercializadas no Brasil usando ensaios de potência. Em geral, a maioria das amostras foi aprovada pelas exigências das farmacopéias. Entretanto, amostras não aprovadas que apresentaram potência superior a 110% podem representar um risco de sangramento para os pacientes, além de potencializar outros riscos, como

a trombocitopenia induzida por heparina. Assim, é necessário monitorar as heparinas continuamente para reduzir os riscos inerentes ao seu uso e proteger a saúde pública.

O monitoramento da potência das heparinas comerciais é de grande importância para a vigilância sanitária, pois, além de verificar sua conformidade com as normas vigentes, também pode orientar as ações estratégicas da Anvisa e de outras agências reguladoras quanto ao uso seguro desse produto.

No entanto, o monitoramento laboratorial dos pacientes por meio do ensaio de coagulação (aPTT) é essencial para avaliar a resposta terapêutica da heparina. Ele pode ajudar a detectar alterações causadas por eventuais falhas de qualidade, garantindo sua eficácia e segurança.

## REFERÊNCIAS

- Mulloy B, Hogwood J, Gray E, Lever R, Page CP. Pharmacology of heparin and related drugs. *Pharmacol Rev*. 2016;68(1):76-141. <https://doi.org/10.1124/pr.115.011247>
- Vaccari SF, Brum Júnior L, Masiero SMK, Fronza M, Dalmora SL. Avaliação comparativa da atividade biológica de heparinas não-fracionadas em produtos farmacêuticos. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2003;25(2):103-10. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842003000200006>
- Cavalheiro Filho C, Chamone DAF, Rached RA, Maffei FH. Heparinas: momento atual. *Rev Assoc Med Bras*. 2008;54(6):471-2. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302008000600001>
- Oduah EI, Linhardt RJ, Sharfstein ST. Heparin: past, present, and future. *Pharmaceuticals*. 2016;9(3):1-12. <https://doi.org/10.3390/ph9030038>
- Abbott EC, Gornall AG, Sutherland DJ, Laidlaw JC, Stiefel M. The influence of a heparin-like compound on hypertension, electrolytes, and aldosterone in man. *Can Med Assoc J*. 1966;94(22):1155-64.
- Susic D, Mandal AK, Jovovic D, Stojanov M, Djordjevic-Denic G, Kentera D. Antihypertensive action of heparin: role of the renin-angiotensin-aldosterone system and prostaglandins. *J Clin Pharmacol*. 1993;33(4):342-7. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1993.tb04667.x>
- Lever R, Page CP. Novel drug development opportunities for heparin. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(2):140-8. <https://doi.org/10.1038/nrd724>
- Glauser BF, Santos GRC, Silva JD, Tovar AMF, Pereira MS, Vilanova E et al. Chemical and pharmacological aspects of neutralisation of heparins from different animal sources by protamine. *J Thromb Haemost*. 2018;16(9):1789-99. <https://doi.org/10.1111/jth.14221>
- Vilanova E, Vairo BC, Oliveira SMCG, Glauser BF, Capillé NV, Santos GRC et al. Heparins sourced from bovine and porcine mucosa gain exclusive monographs in the Brazilian pharmacopeia. *Front Med*. 2019;6:1-8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00016>
- Ahouagi AE, Simoni CR, Azevedo EA, Silva EV, Nascimento MMG, Rosa MB et al. Heparina: erros de medicação, riscos e práticas seguras na utilização. *Boletim ISPM*, 2/5. 2013.
- Niccolai CS, Hicks RW, Oertel L, Francis JL. Heparin Consensus Group - HCG. Unfractionated heparin: focus on a high-alert drug. *Pharmacotherapy*. 2004;24(8 pt. 2):146S-55S. <https://doi.org/10.1592/phco.24.12.146S.36107>
- Institute for Healthcare Improvement - IHI. Introduction to trigger tools for identifying adverse events. Cambridge: Institute for Healthcare Improvement; 2022[acesso 27 jun 2022]. Disponível em: <http://www.ihl.org/IHI/Topics/PatientSafety/SafetyGeneral/Tools/IntroTriggerToolsforIdentifyingAEs.htm>
- Bezerra ALQ, Silva AEBC. Análise de queixas técnicas e eventos adversos notificados em um hospital sentinela. *Rev Enferm UERJ*. 2009;17:467-72.
- Junqueira DRG, Viana TG, Peixoto ERM, Barros FCR, Carvalho MG, Perini E. Farmacovigilância da heparina no Brasil. *Rev Assoc Med Bras*. 2011;57(3):328-32. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302011000300017>
- Kondashevskaya MV. Horizons of heparin therapy in COVID-19 and pandemic-related diseases. *J Evol Biochem Physiol*. 2022;58(2):523-34. <https://doi.org/10.1134/S002209302202020X>
- Hippensteel JA, LaRiviere WB, Colbert JF, Langouët-Astrié CJ, Schmidt EP. Heparin as a therapy for COVID-19: current evidence and future possibilities. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2020;319(2):L211-7. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00199.2020>
- Gozzo L, Viale P, Longo L, Vitale DC, Drago F. The potential role of heparin in patients with COVID-19: beyond the anticoagulant effect: a review. *Front Pharmacol*. 2020;21:11:1-8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01307>
- Haybar H, Maniati M, Saki N, Zayeri ZD. COVID-19: imbalance of multiple systems during infection and importance of therapeutic choice and dosing of cardiac and anti-coagulant therapies. *Mol Biol Rep*. 2021;48(3):2917-28. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06333-w>
- Gomes WJ, Braile DM. A busca de soluções para o problema das heparinas no mercado nacional. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2009;24(2):1-2. <https://doi.org/10.1590/S0102-76382009000200002>



20. Smythe MA, Nutescu EA, Wittkowsky AK. Changes in the USP heparin monograph and implications for clinicians. *Pharmacotherapy*. 2010;30(5):428-31. <https://doi.org/10.1592/phco.30.5.428>
21. Devlin A, Mycroft-West C, Procter P, Cooper L, Guimond S, Lima M et al. Tools for the quality control of pharmaceutical heparin. *Medicina*. 2019;55(10):1-19. <https://doi.org/10.3390/medicina55100636>
22. Deutscher Apotheker. USP 42 - NF 37 The United States pharmacopeia and national formulary 2019: main edition plus supplements 1 and 2. Stuttgart: Deutscher Apotheker; 2018.
23. Alexander W. Heparin revisions: a call for heightened vigilance and monitoring. *P T*. 2009;34(11):634-8.
24. Melo EI, Pereira MS, Cunha RS, Sá MPL, Mourão PAS. Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2008;23(2):169-174. <https://doi.org/10.1590/S0102-76382008000200004>
25. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Farmacopeia brasileira. 5a ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010.
26. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC Nº 59 de 3 de fevereiro de 2016. Aprova o primeiro suplemento da farmacopeia brasileira, 5ª edição, e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 4 fev 2016.
27. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução RDC Nº 101, de 12 de agosto de 2016. Dispõe sobre a inclusão da monografia de heparina sódica suína no 1º suplemento da 5ª edição da farmacopeia brasileira. *Diário Oficial União*. 13 ago 2016.
28. Haas T, Spielmann N, Mauch J, Schmutz M, Weiss M. Correlation of activated clotting times and standard laboratory coagulation tests in paediatric non-cardiac surgery. *Scand J Clin Lab Invest*. 2013;73(1):29-33. <https://doi.org/10.3109/00365513.2012.732239>
29. Culliford AT, Gitel SN, Starr N, Thomas ST, Baumann FG, Wessler S et al. Lack of correlation between activated clotting time and plasma heparin during cardiopulmonary bypass. *Ann Surg*. 1981;193(1):105-11. <https://doi.org/10.1097/0000658-198101000-00017>
30. Walenga JM, Jeske WP, Hoppensteadt D, Cunanan J, Khan H, Escalante V et al. Comparative studies on branded enoxaparin and a US generic version of enoxaparin. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2013;19(3):261-7. <https://doi.org/10.1177/1076029612463427>
31. Leizorovicz A, Siguret V, Mottier D. Safety profile of tinzaparin versus subcutaneous unfractionated heparin in elderly patients with impaired renal function treated for acute deep vein thrombosis: the Innohep® in renal insufficiency study (IRIS). *Thromb Res*. 2011;128(1):27-34. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.03.002>
32. Farooq V, Hegarty J, Chandrasekar T, Lamerton EH, Mitra S, Houghton JB et al. Serious adverse incidents with low molecular weight heparins use in patients with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2004;43(3):531-7. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2003.11.012>
33. Tan X, Cui H. Comparative studies on the biological activity of generic and branded enoxaparin *in vivo* and *in vitro*. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015;26(7):805-10. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000350>
34. Qneibi D, Ramacciotti E, Macedo AS, Caffaro RA, Agati LB, Siddiqui F et al. Comparative studies on the anticoagulant profile of branded enoxaparin and a new biosimilar version. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2020;26:1-7. <https://doi.org/10.1177/1076029620960820>

#### Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) por financiarem e possibilitarem o desenvolvimento deste estudo.

#### Contribuição dos Autores

Martins JF, Medeiros RJ, Machado TSC - Concepção, planejamento (desenho do estudo), aquisição, análise, interpretação dos resultados e redação do trabalho. Gonçalves NP, Maciel-Magalhães M - Aquisição, análise, interpretação dos resultados e redação do trabalho. Todos os autores aprovaram a versão final do trabalho.

#### Conflito de interesses

Os autores não têm nenhum conflito de interesse em potencial a declarar, relacionado aos pares e instituições políticas ou financeiras deste estudo.



Licença CC BY. Com essa licença os artigos são de acesso aberto que permite o uso irrestrito, a distribuição e reprodução em qualquer meio desde que o artigo original seja devidamente citado.