

DALVIM PEREIRA DOS ANJOS

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE HEPARINAS
NÃO-FRACIONADAS PELOS MÉTODOS DA INIBIÇÃO DA COAGULAÇÃO
DO PLASMA OVINO (ICPO) E DO TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL
ATIVADA (TTPA)

PPGVS/ INCQS

FIOCRUZ

2010

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE HEPARINAS
NÃO-FRACIONADAS PELOS MÉTODOS DA INIBIÇÃO DA COAGULAÇÃO
DO PLASMA OVINO (ICPO) E DO TEMPO DE TROMBOPLASTINA
PARCIAL ATIVADA (TTPA)

Dalvim Pereira dos Anjos

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientador: Prof. Dr. Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida

Colaborador: André Plastino

Rio de Janeiro

2010

Anjos, Dalvim Pereira dos

Avaliação Comparativa da Atividade Biológica de Heparinas Não-Fracionadas pelos Métodos da Inibição da Coagulação do Plasma Ovino (ICPO) e do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA). / Dalvim Pereira dos Anjos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2010.

xv, 60 f.il., tab.

Orientador: Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida
Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, INCQS, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, 2010.

1. Heparina. 2. Controle da Qualidade. 3. Tempo de Tromboplastina Parcial.
I.Título.

Comparative evaluation of biological activity of unfractionated heparin by methods of sheep plasma coagulation inhibition assay (SPCIA) and activated partial thromboplastin time (APTT)

FOLHA DE APROVAÇÃO

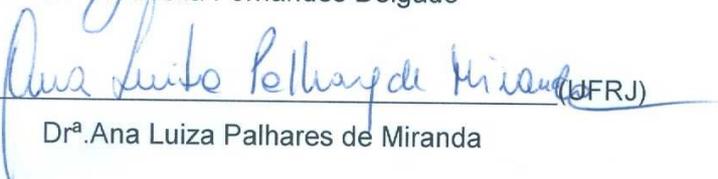
Avaliação Comparativa da Atividade Biológica de Heparinas Não- Fracionadas pelos Métodos da Inibição da Coagulação do Plasma Ovino (ICPO) e do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA).

Dalvim Pereira dos Anjos

Dissertação de Mestrado Profissional submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professor convidado de outra instituição, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Vigilância Sanitária.

Prof^a.  (INCQS/FIOCRUZ)

Dr^a. Isabella Fernandes Delgado

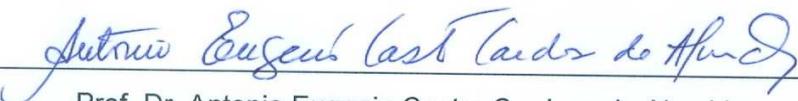
Prof^a.  (bFRJ)

Dr^a. Ana Luiza Palhares de Miranda

Prof.  (INCQS/FIOCRUZ)

Dr. Wlamir Correa de Moura

Orientador:



Prof. Dr. Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida

INCQS/FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2010

Dedico este trabalho

À Deus, os meus mais sinceros agradecimentos pela proteção e amparo durante vários momentos ao longo dessa minha jornada e principalmente por ter colocado pessoas certas, nas horas certas em minha vida...

À minha esposa Rosileia, pela paciência, companheirismo, carinho, incentivo, compreensão e por todas as alegrias que compartilhamos juntos, durante todo esse tempo. Certamente, o nosso amor está às margens da perfeição.

Aos meus filhos Jorge Henrique e Lucas Vinicius. Sinônimos de amor, amizade, companheirismo e inteligência.

Aos meus pais e meus sogros respectivamente (*in memoriam*), Danglar e Albina, João e Ainemer, sábios lutadores que sempre me deram força e mostraram, com exemplos, o caminho certo a ser trilhado.

Finalmente, a todos que de alguma maneira me motivam a continuar estudando e que tanto contribuem para meu desenvolvimento.

*“Para obter algo que você nunca teve,
é preciso fazer algo que nunca fez”*

Francisco Cândido Xavier

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não ficaria completo sem agradecer aos que me ajudaram a concretizá-lo:

Ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da FIOCRUZ, pela oportunidade de cursar o mestrado profissional neste patrimônio da ciência nacional.

Ao Alexandre Alves de S.Oliveira Dias, Fernando Faria Fíngola, Jarbas Emilio dos Santos, João Ferreira Martins, Lucia Maria Correia Werneck, Michele Cardoso do Nascimento, Nelson Luiz da Silva Pedreira e Will Robson Dias Lameirão, pela amizade e apoio incondicional.

Ao Alexandre Medeiros, Alvaro da Silva Ribeiro, Antonio Carlos Gaspar de Vasconcellos, Prof. Dr^a. Ana Cristina Martins de Nogueira, Carlos Eduardo Silva, Prof. Dr^a. Celia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão, Eduardo Jorge Rabelo Netto, Prof. Dr^a. Helena Pereira da Silva Zamith, Prof. Dr. Ivano R. V. Filippis Capasso, Reginelena Ferreira da Silva, Rubens Ramos Junior, Sergio Alves da Silva, Sergio Wilton Bezerra e Prof. Dr. Wlamir Correa de Moura que me auxiliaram nas diversas etapas deste trabalho.

*“...My enemies eyes will not see me
and have weapons will not reach me...”*

George's Prayer

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Considero que a elaboração de uma tese é um produto coletivo embora sua redação, responsabilidade e *stress* sejam predominantemente individuais, entretanto duas pessoas contribuíram bastante para que este trabalho chegasse a bom termo e a elas registro minha gratidão:

Ao meu orientador ***Prof. Dr. Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida*** pelo apoio, amizade, confiança... Saiba que você foi muito mais do que orientador... Foi e será o amigo que para sempre irá ocupar um espaço enorme em meu coração!

Ao meu chefe, colaborador e amigo ***André Plastino*** a quem tenho grande admiração e respeito profissional, pela oportunidade de realização desse trabalho, por ter aceitado despende do seu tempo e conhecimento técnico-científico para auxiliar na elaboração deste projeto e principalmente por ter acreditado na minha capacidade, além do constante estímulo no campo científico e paciência nas incontáveis horas de orientação.

Aquele que cede ante ao obstáculo e que desiste
diante da dificuldade já perdeu a batalha, sem a ter enfrentado.

Não raro, o obstáculo e a dificuldade são mais
aparentes que reais, mais ameaçadores do que impeditivos.

Só se pode avaliar após o enfrentamento!

Ademais, cada vitória conseguida torna-se aprimoramento
da forma de vencer e cada derrota ensina a maneira
como não se deve tentar a luta...

Essa conquista é proporcionada mediante o esforço
de prosseguir sem desfalecimento e insistir após
cada pequeno ou grande insucesso.

O objetivo deve ser conquistado, e para tanto, a
coragem do esforço contínuo é indispensável.

Muitas vezes será necessário parar para refletir,
recuar para renovar forças e avançar sempre.

É uma salutar estratégia aquela que faculta perder
agora o que é de pequena monta para ganhar
resultados permanentes e de valor expressivo depois.

Joanna de Angelis

RESUMO

A heparina é um polissacarídeo sulfatado usado como droga anticoagulante com diferentes preparações comerciais disponíveis no mercado brasileiro. Em fevereiro de 2008, seu uso foi relacionado a uma centena de mortes nos Estados Unidos onde foi detectada a contaminação de alguns lotes por sulfato de condroitina. Este fato fez crescer mundialmente a busca por ensaios laboratoriais que garantam sua segurança e eficácia.

Neste trabalho foram avaliados comparativamente, cinco lotes procedentes de diferentes produtores de heparinas não-fracionadas, de origem suína ou bovina. Estas amostras foram testadas contra o 5^o Padrão Internacional de Heparina de Mucosa Intestinal Suína, provenientes de coletas efetuadas pelas autoridades sanitárias para análise quanto à pureza e potência anticoagulante, pelos dois métodos farmacopéicos: a Inibição da Coagulação do Plasma Ovino (ICPO) e o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA), no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), laboratório nacional de controle.

Os resultados obtidos (potências médias de 104,71% e 106,17%, respectivamente) apontaram boa concordância entre os métodos, além de comprovar que o TTPA apresenta metodologia mais simples e rápida devido à utilização do coagulômetro para a medição do tempo de formação de coágulos, em detrimento da leitura subjetiva com observação visual dos graus de coagulação adotado pelo ICPO.

A implantação e a execução do TTPA, em paralelo à utilização do ICPO, permitirá uma melhoria na avaliação da segurança e eficácia de heparinas não-fracionadas.

ABSTRACT

Heparin is a sulfated polysaccharide used as anticoagulant having several commercial preparations in use in Brazil. In February 2008, hundreds of deaths, in the United States, were associated with its use due to a contamination with chondroitin sulfate. This fact started a worldwide search for laboratory tests that could ensure safety and effectiveness of the compound.

On this study were comparatively evaluated five lots from different producers of non-fractionated heparins from porcine or bovine origin. These samples were tested against the 5th International Standard for heparin from swine intestinal mucosa, collected by Sanitary Authorities aiming to evaluate their purity and anticoagulant potency by two Pharmacopoeic methods: Sheep Plasma Coagulation Inhibition (SPCIA) and Partial Thromboplastin Activated Time (APTT) at the National Institute of Quality Control in Health (INCQS), the National Control Laboratory.

The obtained results (mean potencies of 104,71% and 106,17% respectively) indicated excellent correlation between the methods, supporting the use of the APTT method, since it is easier and faster to perform due to the use of coagulometer for the measurement of clot-forming time, instead of the subjective visual observation of the degree of coagulation adopted by the SPCIA.

The standardization and routine use of the APTT in parallel to the use of the SPCIA, will allow an increase in the assurance of the safety and the efficacy of non-fractionated heparins, during their quality control.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BM	Banho-Maria
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEC	Circulação Extra Corpórea
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de Variação
ECZ	Eletroforese Capilar por Zonas
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare
FDA	Food and Drug Administration
FII	Fator da Coagulação Sangüínea 2
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FXa	Fator da Coagulação Sangüínea 10 Ativado
FXII	Fator da Coagulação Sangüínea 12
HBPM	Heparinas de Baixo Peso Molecular
HNF	Heparinas Não-Fracionadas
IC	Intervalo de Confiança

ICPO	Índice de Coagulação do Plasma Ovino
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
NIEHS	National Institute of Environmental Health Sciences
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Probabilidade
POP	Procedimento Operacional Padronizado
P/V	Peso por volume
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SBCCV	Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular
TIH	Trombocitopenia Induzida por Heparina
TP	Tempo de Protrombina
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado
TVP	Tromboembolismo Venoso Profundo
UI/mL	Unidades Internacionais por mililitro
WHO	World Health Organization
\bar{x}	Média Aritmética

LISTA DE QUADROS, TABELAS E GRÁFICOS

Quadro 1 — Heparinas Comerciais de Baixo Peso Molecular.....	07
Quadro 2 — Comparação entre as Terapias Heparínicas.....	08
Tabela 1 — Protocolo de Respostas do ICPO.....	19
Tabela 2 — Resultados ICPO x TTPA – Padrão (Potência Conhecida).....	24
Tabela 3 — Resultados ICPO x TTPA - Produtor 1 (Amostra de Referência).....	25
Tabela 4 — Resultados ICPO x TTPA - Produtor 2.....	26
Tabela 5 — Resultados ICPO x TTPA - Produtor 3.....	27
Tabela 6 — Resultados ICPO x TTPA - Produtor 4.....	28
Tabela 7 — Resultados ICPO x TTPA - Produtor 5.....	29
Gráfico 1 — Curva Dose-Resposta de Heparina pelo Método TTPA.....	21
Gráfico 2 — Resultados ICPO x TTPA.....	30
Gráfico 3 — Correlação dos Resultados ICPO x TTPA.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — A Molécula de Heparina.....	02
Figura 2 — Os Mucopolissacarídeos.....	03
Figura 3 — Inibição Farmacológica da Coagulação pela Ação da Heparina...06	
Figura 4 — Moléculas de Heparina e Sulfato de Condroitina.....	12
Figura 5 — Esquema do Ensaio ICPO.....	20
Figura 6 — Esquema do Ensaio TTPA.....	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Considerações Gerais.....	01
2. A HEPARINA.....	02
2.1. Características.....	02
2.2. Ação no Organismo.....	04
2.3. A Importância.....	04
2.4. Mecanismo de Ação.....	05
2.5. Classificação.....	06
2.6. Avaliação Comparativa das Terapias Heparínicas.....	07
3. O CONTROLE DA QUALIDADE.....	09
3.1. Avaliação da Atividade Biológica da Heparina.....	09
3.2. Avaliações Analítico Laboratoriais.....	10
3.3. O Episódio Heparina X Sulfato de Condroitina.....	11
4. O INCQS.....	12
4.1. O INCQS e o Sistema Brasileiro de Vigilância Sanitária.....	12
4.2. Modalidades de Análises.....	13
4.3. Validação de Metodologias Analíticas.....	14
5. OBJETIVOS.....	15
5.1. Objetivo Geral.....	15
5.2. Objetivos Específicos.....	15

6. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
6.1. Reagentes e Produtos Farmacêuticos.....	16
6.2. Equipamentos e Instrumentos.....	16
6.3. Avaliação dos Métodos.....	17
6.4. Método da Inibição da Coagulação do Plasma Ovino (ICPO).....	18
6.5. Método do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA).....	21
7. RESULTADOS.....	24
7.1. Critérios de Comparação Analítica.....	24
7.2. Avaliação Estatística.....	31
7.2.1. Precisão dos Métodos.....	31
7.2.2. Exatidão.....	31
7.2.3. Validação da Metodologia TTPA.....	32
8. DISCUSSÃO.....	34
9. CONCLUSÕES.....	37
10. REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

Devido às mudanças no estilo de vida e hábitos alimentares da população, atualmente os casos de doenças crônico-degenerativas vêm aumentando, sendo as cardiovasculares as principais causas de morte em vários países, além de influenciar aposentadorias por invalidez e afastamentos do trabalho em todo mundo (SOUZA, 1999; MEIRA, 2004).

Pesquisas relacionadas ao tratamento anticoagulante do tromboembolismo venoso profundo (TVP) iniciadas na década de 1940 verificaram que grupos específicos de medicamentos (a heparina e os derivados cumarínicos) eram capazes de impedir o crescimento de trombos e que em alguns era essencial que a coagulação fosse inibida, fazendo com que o sangue permanecesse líquido mesmo não estando em contato com as superfícies internas do coração e dos vasos sanguíneos (GOMES, SABÁ & BUFFOLO, 2005). Desta forma, pela sua diversidade, a heparina é utilizada na terapia anticoagulante sendo apontada como um dos principais avanços terapêuticos que almejam a redução da mortalidade e incapacidade física, pois sua utilização visa minimizar os efeitos adversos decorrentes das doenças cerebrovasculares (hemorragia, lesões cutâneas e trombocitopenia) e conseqüentemente reduzir sua morbi-mortalidade (SILVA *et al.*, 2008).

Os inibidores da coagulação sanguínea atuam na prevenção ou impedimento do crescimento de coágulos, além de proporcionar um aumento da expectativa e qualidade de vida em indivíduos com alterações hematológicas que predispõem ao tromboembolismo pulmonar e à trombose venosa profunda, entre outras cardiopatias (HAMERSCHLAK & ROSENFELD, 1996).

Os anticoagulantes dividem-se em dois grupos caracterizados por sua forma de ação: os anticoagulantes de ação direta que por si só, inibem a formação da trombina na cascata proteolítica (*p. ex.* a hirudina) e os anticoagulantes de ação indireta, que agem através da sua interação com outras proteínas (*p. ex.* a heparina não-fracionada e a heparina de baixo peso molecular) (TREJO, 2004).

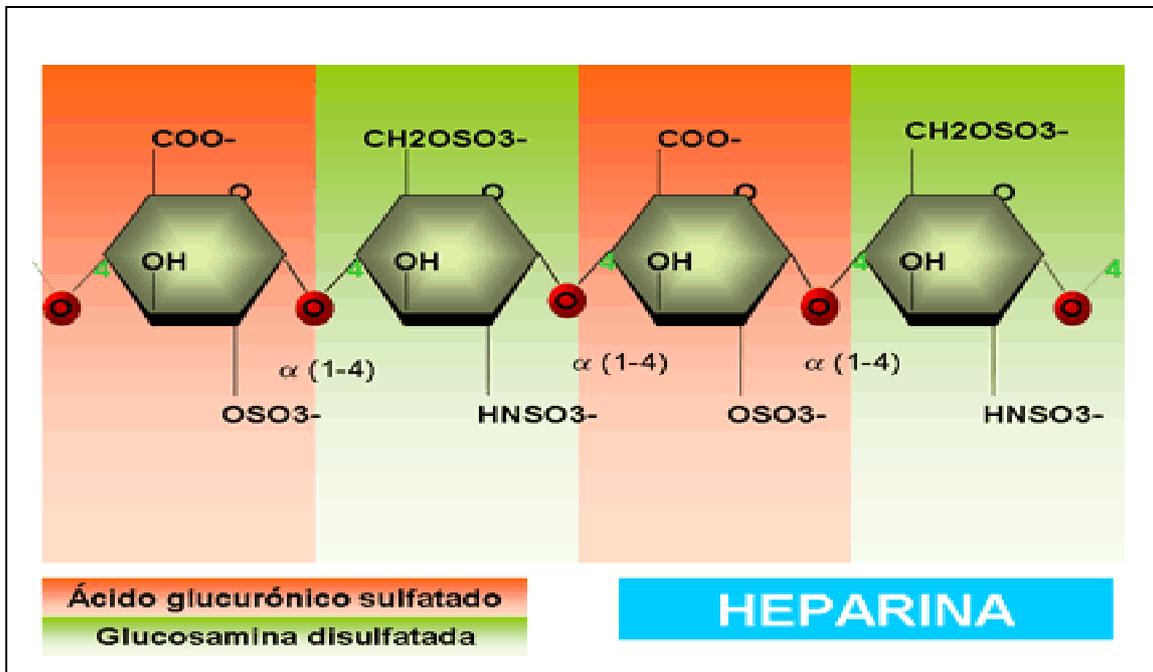
2. A HEPARINA

2.1. Características

Substância natural encontrada abundantemente nas vísceras de suínos e bovinos, utilizada amplamente pelo homem desde a década de 1930 na indução do retardamento da coagulação, em patologias com ocorrência de coagulação sanguínea excessiva, na diálise renal e no tratamento da síndrome coronariana aguda (CATANI *et al.*, 2001).

É um polissacarídeo complexo e altamente ativo composto de unidades dissacarídicas formadas pelo ácido glucurônico e pela glucosamina (figura 1). Sua ação anticoagulante está relacionada aos grupamentos químicos sulfatados que decorrem de grupos aniônicos que interagem com os fatores de coagulação (GUERRINI *et al.*, 2008).

Figura 1. A Molécula de Heparina

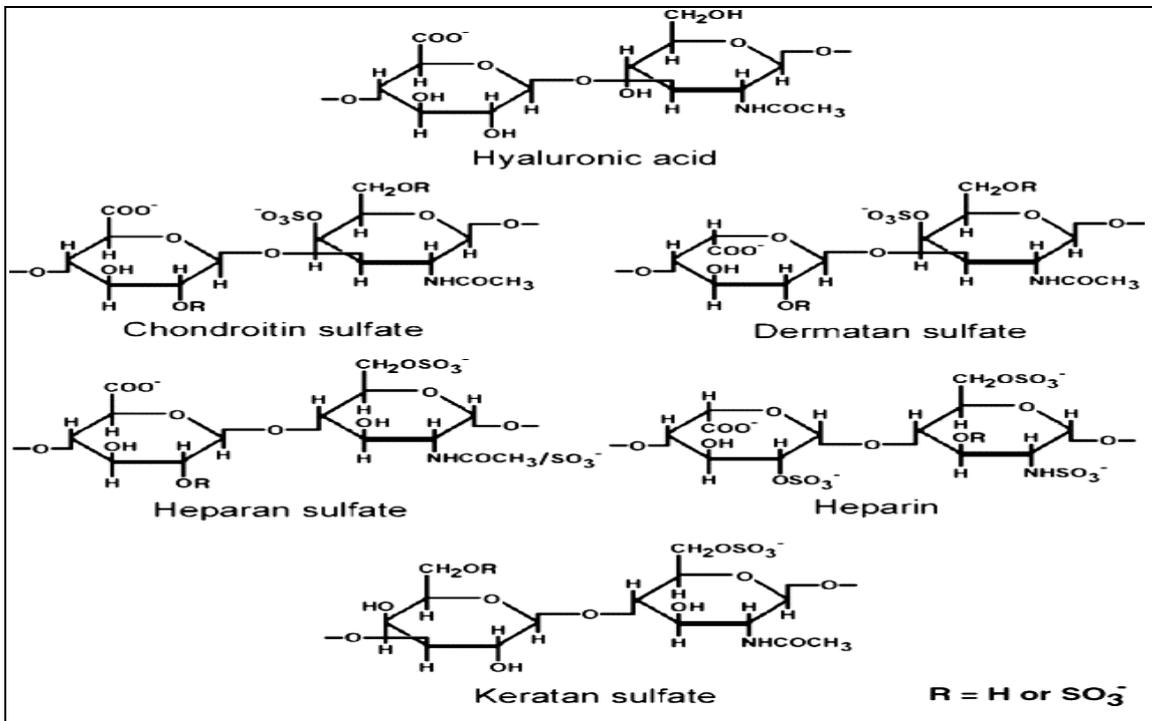


Fonte: CATANI *et al.*, 2001.

A heparina (ácido heparínico) é um anticoagulante presente no organismo humano, sendo definido como um mucopolissacarídeo com alto teor de enxofre (figura 2) — que se assemelha estruturalmente ao ácido hialurônico e ao sulfato de condroitina, substâncias utilizadas no tratamento de osteoartrite — tendo seu papel fisiológico ligado à liberação e ativação de lipoproteínas e lipases hepáticas onde, ao requerer a antitrombina como um cofator, exerce indiretamente seu efeito anticoagulante, além de promover efeitos variáveis na função plaquetária e na fibrinólise (COHEN *et al.*, 2000; MUELLER, 2004).

Os mucopolissacarídeos — grupo de fármacos que se diferenciam pela sua natureza química e efeito biológico — são constituídos de moléculas de alto peso molecular, dispostas em longas cadeias que se fixam nas mucoproteínas, o que explica a sua alta eficácia fisiológica (WALLENTIN *et al.*, 2003).

Figura 2. Os Mucopolissacarídeos



Fonte: FRANCO, 2001.

2.2. Ação no Organismo

A heparina prolonga o tempo de coagulação, favorece a fibronólise, dissolve trombos localizados, evita a formação de novos coágulos e normaliza a consistência de tecidos endurecidos. Além disto, acelera a absorção de coágulos sanguíneos e estimula a regeneração do tecido conjuntivo. Finalmente, produz vasodilatação e melhora a circulação sangüínea, combatendo manifestações de estase (JIN *et al.*, 1997).

Os efeitos adversos relacionados ao uso da heparina são: hemorragias, osteoporose, reações cutâneas, alopecia e alteração dos testes de função hepática, entretanto, o maior é a trombocitopenia (CROWTHER *et al.*, 2000).

A trombocitopenia induzida por heparina (TIH) — mais relacionada ao uso da heparina de origem bovina — está ligada a eventos trombóticos com potencial risco de vida. Tais efeitos colaterais estão relacionados à intolerância dos pacientes ao medicamento e a qualidade da matéria-prima (LONGHI, LAKS & KALIL, 2001; FRANCIS *et al.*, 2003).

2.3. A Importância

A heparina destaca-se pela diversidade de uso na medicina atual, pois apresenta uma série de propriedades farmacológicas que a credenciam como um dos fatores responsáveis por importantes avanços no desenvolvimento de procedimentos cirúrgicos que utilizam medicamentos anticoagulantes, especialmente devido ao desenvolvimento de poucos efeitos colaterais, boa tolerância pelo organismo (podendo ser usada sem inconvenientes por longos períodos) e início de ação imediatamente após sua administração venosa, o que evita a progressão da trombose em procedimentos cirúrgicos cardiovasculares com a utilização da técnica de circulação extracorpórea (CEC) (ORTEL *et al.*, 1992; WALENGA & BICK, 1998).

Estudos clínicos ratificaram o uso da heparina, devido à sua ação farmacológica anti-trombínica, anti-protrombínica e inibidora da aglutinação plaquetária no tratamento do TVP, além do infarto agudo do miocárdio, angina instável e em certos casos de prejuízo circulatório cerebral isquêmico e na prevenção da coagulação na passagem do sangue através de circuitos

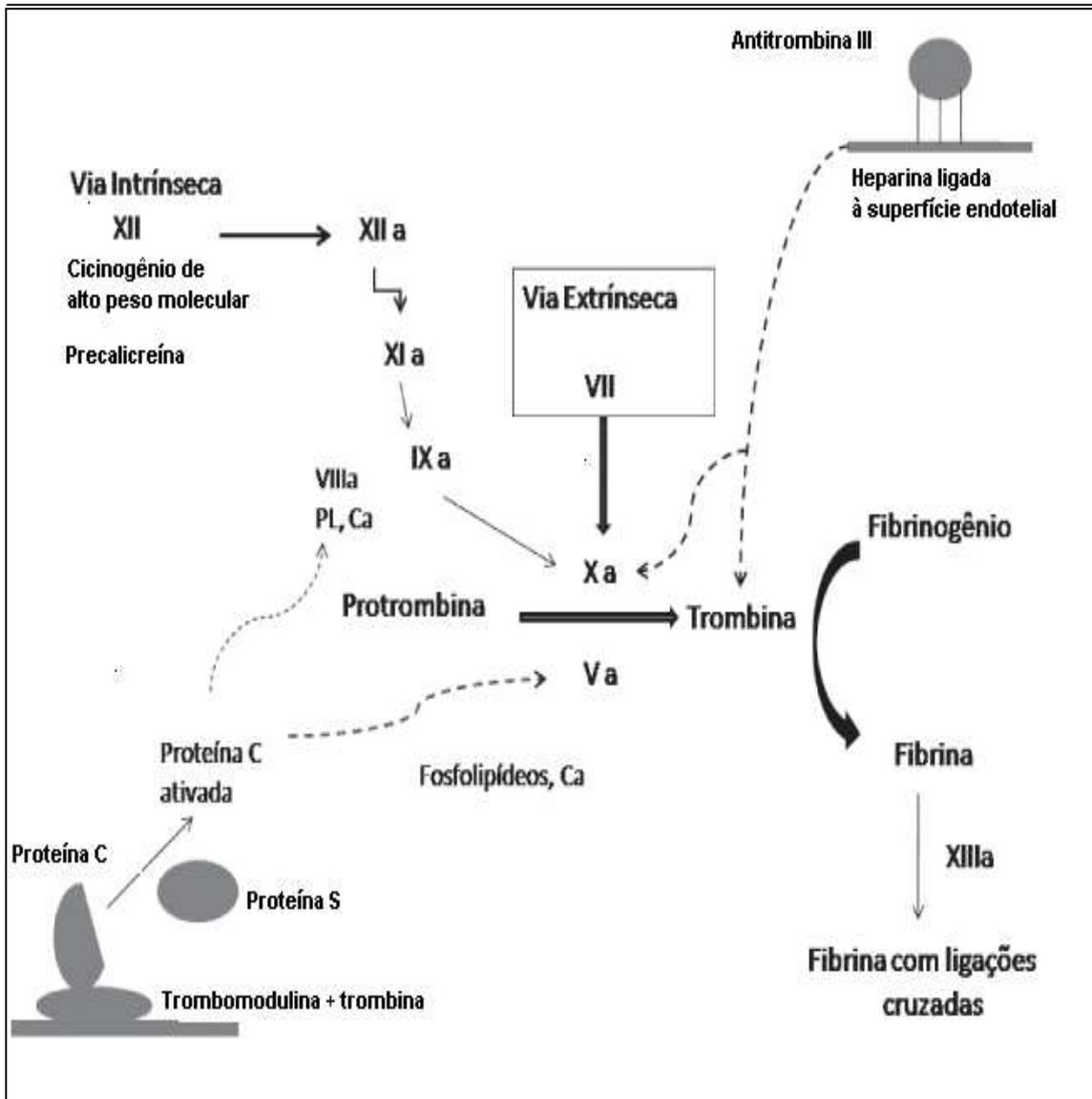
extracorpóreos durante procedimentos de diálise ou em transfusões sangüíneas (CATANI *et al.*, 2001).

O resultado final de suas ações bioquímicas é a inibição da formação e síntese dos fatores ativados da coagulação que exercem funções críticas na formação do coágulo sangüíneo. Além disso, a meia vida curta e dependente da dose, bem como a disponibilidade de um antídoto específico (o sulfato de protamina) conferem-lhe propriedades adicionais de grande relevância (BARROSO *et al.*, 2002). Estas características a tornam o segundo agente terapêutico natural mais utilizado no mundo, superado apenas pela insulina (HARVEY & CHAMPE, 1998).

2.4. Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação anticoagulante da heparina — comprovada na modulação de respostas imunológicas e inflamatórias — consiste em inibir o fator da coagulação FII (protrombina), além de ativar a enzima sangüínea antitrombina III e mais significativamente a trombina, que forma o trombo de fibrina (figura 3), atuando na ocorrência da lesão de um vaso sangüíneo que resulta na formação de um coágulo (GARCES, VICTORINO & VERONESE, 2007).

Figura 3. Inibição Farmacológica da Coagulação pela Ação da Heparina



Fonte: RITT *et al.*, 2008

2.5. Classificação

A heparina é encontrada em duas apresentações clínicas: as Heparinas Não-Fracionadas (HNF) — polissacarídeos que durante o isolamento dos tecidos animais, tornam-se levemente degradados produzindo uma mistura heterogênea de fragmentos com massa molecular entre 3.000 e 30.000 Daltons e as Heparinas de Baixo Peso Molecular (HBPM) — obtidas através da despolimerização controlada da HNF, obtendo-se produtos com massas

moleculares entre 4000 e 6000 Daltons (MAURO *et al.*, 2004). As HBPM (quadro 1) — descobertas na década de 1970, desenvolvidas e lançadas no mercado em 1993 — são formadas por fragmentos, que possuem as mesmas funções das HNF e são consideradas clinicamente mais seguras, tendo efeitos adversos minimizados e conseqüentemente, baixa incidência de eventos hemorrágicos associados ao seu uso (BONEU, 2000). Estas características elevaram o consumo anual deste medicamento em cerca de 10% a 20% ao ano (LONGHI, LAKS & KALIL, 2001).

Quadro 1. Heparinas Comerciais de Baixo Peso Molecular

HBPM	Peso Molecular (Da)
Daltoparina	6000
Nadroparina	4300
Reviparina	4000
Tinzaparina	6000
Enoxaparina	4500
Ardeparina	5300
Certoparina	4000

Fonte: Adaptado de BONEU, 2000.

2.6. Avaliação Comparativa das Terapias Heparínicas

O efeito anticoagulante das HNF decorre de sua alta afinidade pela antitrombina III. Por possuir uma meia-vida curta, sugerem sua administração contínua e devido ao seu metabolismo de primeira passagem, exigem a infusão parenteral. Em contrapartida, as HBPM apresentam menor ação agonista da antitrombina III, com uma maior capacidade de inibição do fator FXa, possuindo melhor absorção após a injeção subcutânea devido a sua meia-vida mais prolongada e farmacocinética mais previsível, requerendo menor controle laboratorial (quadro 2) (WAINSTEIN & RIBEIRO, 2003).

Quadro 2. Comparação entre as Terapias Heparínicas

	Heparinas Não- Fracionadas (HNF)	Heparinas de Baixo Peso Molecular (HBPM)
Ação	Anti-XIIa, XIa, IXa, VIIa, Antitrombina	Principalmente anti-Xa
Via de Administração	Subcutânea e Intravenosa	Subcutânea
Absorção por Via Subcutânea	Lenta	Rápida
Ligação Protéica	Intensa	Reduzida
Biodisponibilidade	SUBCUTÂNEA: 10% -30%(em baixas doses) 90% (em doses maiores) INTRAVENOSA: 100%	> 90%
Meia-vida Efetiva	SUBCUTÂNEA: 1,5 h INTRAVENOSA: 30 min	4 h
Variação do Efeito	Intensa	Mínima
Eliminação	Hepática e Renal	Renal

Fonte: Adaptado de WAINSTEIN & RIBEIRO, 2003.

3. O CONTROLE DA QUALIDADE

3.1. Avaliação da Atividade Biológica da Heparina

O ICPO e o TTPA são ferramentas de triagem de fundamental importância nos parâmetros clínicos para a detecção de distúrbios da coagulação. São ensaios biológicos utilizados na avaliação da potência de heparinas não-fracionadas em produtos farmacêuticos, tendo como base a ativação e aceleração “*in vitro*” de etapas da cascata proteolítica (CARLOS & FREITAS, 2007).

As leituras da reação final destes ensaios se estabelecem em tempos ou em graus de coagulação, relacionados ao 5º Padrão Internacional de heparina de mucosa intestinal suína (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003; VACCARI *et al.*, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009).

O ensaio ICPO, preconizado pela Farmacopéia Brasileira, tem sido amplamente adotado para a avaliação de potência das HNF (VACCARI *et al.*, 2003).

O TTPA (também preconizado pela Farmacopéia Brasileira), é o teste mais comumente empregado para a avaliação das vias intrínseca e comum da cascata proteolítica, além da monitoração do uso de heparinas clássicas (não-fracionadas) em pacientes em tratamento anticoagulante (VACCARI *et al.*, 2003). Sensível às deficiências de desordens hereditárias de coagulação e de doenças hepáticas, o TTPA apresenta também a vantagem de permitir uma triagem, de modo que testes específicos possam ser adequadamente efetuados no diagnóstico das alterações da coagulação sangüínea, tornando-se um parâmetro sensível a deficiências de fatores do sistema intrínseco da coagulação, antes da etapa de conversão da protrombina em trombina e geralmente, é escolhido para o diagnóstico de hemofilias (CARLOS & FREITAS, 2007).

No entanto, dos dois métodos preconizados para avaliação da potência das heparinas convencionais (não-fracionadas) — métodos ICPO e TTPA — apenas o primeiro está implantado, sendo realizado rotineiramente pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Desta forma, é através da avaliação comparativa dos ensaios farmacopéicos de

determinação da atividade biológica de heparinas não-fracionadas que fundamentamos este estudo.

3.2. Avaliações Analítico-Laboratoriais

As coagulopatias podem originar-se de diversos componentes do sistema hemostático (plaquetas, vasos sangüíneos ou mecanismo de coagulação), envolvidos isoladamente ou em conjunto. São várias as possibilidades de distúrbios no processo de coagulação (fatores de coagulação deficiente, ausente ou presente em uma forma defeituosa ou inativa), sendo de origem genética ou adquirida, levando os especialistas a utilizarem-se de vários métodos para diagnosticar as causas das alterações que ocorrem no processo da coagulação sangüínea. Além da presença de inibidores da coagulação, tais fatos podem ser decorrentes de alterações quantitativas e qualitativas dos fatores da coagulação, que são reveladas através de investigações laboratoriais que desta forma, indicam a suspeita de algum tipo de alteração no mecanismo da coagulação sangüínea, ou ainda servem como parâmetro pré-operatório (DUBOSCQ & KORDICH, 2005).

As provas pré-operatórias habitualmente empregadas são o Tempo de Coagulação e Sangria, o Tempo de Protrombina (TP), a Contagem Global das Plaquetas, além dos ensaios para determinação do Índice de Coagulação do Plasma Ovino (ICPO) e do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA), (WIINBERG *et al.*, 2007; MELO, 2008).

3.3. O Episódio Heparina x Sulfato de Condroitina

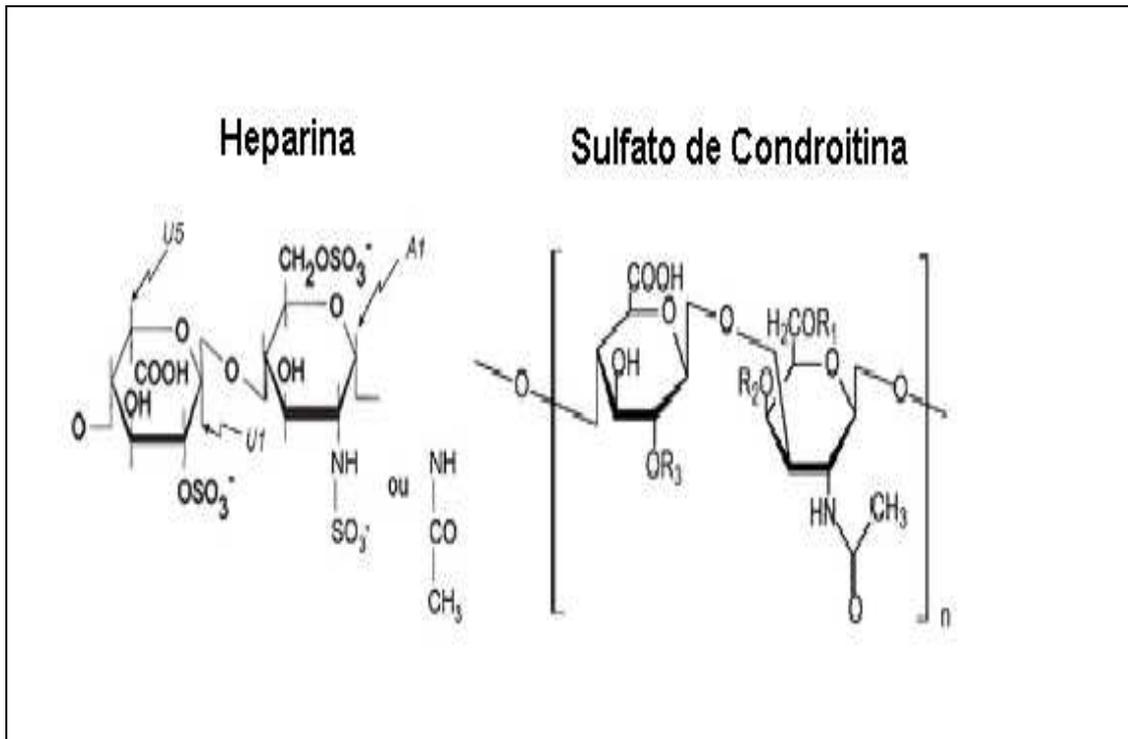
Atualmente, diferentes preparações comerciais de heparina estão disponíveis em todo o mundo e grande parte de seu princípio ativo é produzido na China, pela grande criação de suínos e pela política de diminuição dos custos de sua produção (CAVALHEIRO FILHO *et al.*, 2008; ANDREO FILHO, 2009).

Segundo a Câmara de Comércio da China, durante o primeiro trimestre de 2009, a exportação da matéria-prima heparina sódica foi de 30 toneladas, com um aumento de 100% em relação a 2008, ano da divulgação de problemas associados a heparinas contaminadas (KISHIMOTO *et al.*, 2008).

Recentemente a demanda por avaliações de natureza fiscal aumentou, devido à contaminação em seu processo de produção pelo sulfato de condroitina hipersulfatado, que causou cerca de uma centena de mortes nos Estados Unidos (CAVALHEIRO FILHO, 2008; WHO, 2008). Este fato levou o Food and Drug Administration (FDA) e o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) — órgãos americanos responsáveis pela fiscalização de alimentos e medicamentos — a fazer um informe mundial, em fevereiro de 2008, quanto aos cuidados e instruções no uso de HNF (CDC, 2008; FDA, 2008).

De acordo com as investigações, o sulfato de condroitina — medicamento indicado como suplemento alimentar para o tratamento e prevenção da osteoartrite — é comercializado a um vigésimo do preço da heparina (cerca de US\$ 20/kg versus US\$ 2.000/kg). Assim, há especulações que o contaminante foi adicionado, deliberadamente, para aumentar o lucro dos fabricantes, já que apresenta estrutura química análoga a heparina, entretanto não possuindo atividade anticoagulante, mas quando quimicamente modificado por meio de supersulfatação, adquire atividade anticoagulante (figura 4), transformando-se em seu mimético (não detectável por metodologia analítica convencional, mas somente por técnicas de alta resolução ortogonal: Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Eletroforese Capilar por Zonas (ECZ) (GUERRINI *et al.*, 2008; NOTHENBERG, 2008; SBCCV, 2008).

Figura 4. Moléculas de Heparina e Sulfato de Condroitina



Fonte: NOTHENBERG, 2008.

4. O INCQS

4.1. O INCQS e o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária

Devido à maior incidência das doenças trombóticas, as heparinas passaram a produzir grande impacto para a saúde pública e também para a área sócio-econômica, causando um aumento exponencial em sua produção e consumo com repercussões econômicas globais, com uma estimativa de que aproximadamente 20 milhões de pacientes usem as heparinas para tratamento ou profilaxia de possíveis danos ao organismo. Este fato promoveu um aumento das políticas globais de vigilância sanitária com a elaboração de ações de controle da qualidade desde sua etapa de produção (WHO, 2005; WHO, 2008; WU, 2009).

Em âmbito nacional o INCQS — unidade da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e órgão de referência para as questões normativas e analítico-laboratoriais relativas ao controle da qualidade de insumos, produtos,

ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária — atua de forma participativa na integração das atividades fiscais e analíticas, organizando uma estrutura que permita identificar, avaliar e gerenciar riscos à saúde humana, em conexão com o desenvolvimento e implantação de novas metodologias.

4.2. Modalidades de Análises

A qualidade na coleta, acondicionamento e transporte, além das análises laboratoriais, fazem parte do conjunto de ações que irão confirmar ou dirimir dúvidas quanto à sua qualidade e subsidiarão as ações de fiscalização em amostras suspeitas de apresentar riscos à saúde pública. A coleta de amostras das heparinas disponíveis no mercado é de responsabilidade dos órgãos de vigilância sanitária e as análises laboratoriais, de responsabilidade do INCQS. A amostragem consiste na colheita representativa do estoque existente, realizada em triplicata (do mesmo lote e em quantidades iguais), onde uma das partes é entregue ao responsável pelo local onde ocorreu a coleta — amostra de contraprova — e as duas outras imediatamente encaminhadas ao INCQS, sendo uma para a realização das análises e outra como amostra-testemunho (BRASIL, 1977; BRASIL, 1998).

Após a fase de coleta de amostras pelo órgão sanitário competente, o controle analítico é realizado através das diferentes modalidades analíticas previstas na legislação. A modalidade de análise prévia será efetuada para avaliar se o produto pode ser objeto de registro. A modalidade de análise de controle será efetuada após a distribuição do produto para o consumo, além de destinar-se a comprovação da sua conformidade com a fórmula que deu origem ao registro e a modalidade de análise fiscal será realizada com a finalidade de fornecer subsídios às ações pertinentes quanto à apreensão de produtos para apuração de infração ou verificação de ocorrência fortuita ou eventual (ROZENFELD, 2000).

4.3. Validação de Metodologias Analíticas

A validação — processo de avaliação da confiabilidade de resultados metodológicos — deve garantir, através de estudos experimentais, que determinado ensaio analítico atende a critérios (precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e estabilidade) adequados à determinada metodologia analítica (NIEHS, 1997).

Não há níveis de reprodutibilidade ótimos ou mínimos ou associados ao evento de interesse que deverão ser alcançados para uma validação de sucesso. Os níveis de confiabilidade e relevância necessários dependerão das condições sob as quais o teste será usado e o propósito ao qual seus resultados serão aplicados (ROBINSON, 2003). De acordo com estes critérios, o analista, além de ser qualificado e adequadamente treinado, deve utilizar equipamentos e materiais devidamente calibrados e substâncias químicas de referência e/ou padrões biológicos farmacopéicos (FRAZIER, 1990; BALLS *et al.*, 1999).

De acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) é fundamental que os laboratórios validem suas metodologias, para que seus resultados sejam confiáveis e adequados à qualidade pretendida, ressaltando a importância da qualidade analítica como um dos instrumentos fundamentais para a proteção e promoção da saúde da população (BRASIL, 2002).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

- Avaliar a atividade biológica de heparinas não-fracionadas em produtos farmacêuticos coletados pelos órgãos de Vigilância Sanitária, através dos dois métodos preconizados pela Farmacopéia Brasileira: o Índice de Coagulação do Plasma Ovino (ICPO) e o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA).

5.2. Objetivos Específicos

- Avaliar comparativamente os resultados analíticos pelos métodos ICPO e TTPA;
- Avaliar a confiabilidade dos dois métodos analíticos para nortear cientificamente a opção de uso no laboratório;
- Validar o ensaio de avaliação da potência de heparinas não-fracionadas pelo método TTPA no INCQS.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Reagentes e Produtos Farmacêuticos

- 5º Padrão Internacional de Heparina de mucosa intestinal suína (WHO 97/578), contendo 2.031 UI/ampola;
- Plasma ovino citratado (produzido por Bionutrientes do Brasil Ltda);
- Plasma humano citratado liofilizado (produzido por Trinity Biotech Product — AMAX lote A1926);
- Cefalina ativada (produzida por Diagnóstica Stago — lote 101567);
- CaCl_2 mM (produzido por Diagnóstica Stago — lote 041605);
- Cinco amostras heparinas não-fracionadas (contendo 5.000 UI/mL ou 5000 UI/ 0,25 UI/mL), de diferentes fabricantes — identificadas com números de 1 a 5 — originárias de coletas efetuadas por órgãos de vigilância sanitária para avaliações quanto à potência anticoagulante pelo INCQS.

6.2. Equipamentos e Instrumentos

- Coagulômetro STAGO modelo ST 4 ART;
- Banho-maria Marconi ultratermostatizado modelo MA 095;
- Cronômetro digital Mondaine modelo EX 0628.

6.3. Avaliação dos Métodos

Foram analisadas em quadruplicata pelos métodos do ICPO e TTPA, sem o conhecimento prévio de suas características (estudo cego), cinco amostras de heparinas não-fracionadas, de diferentes fabricantes, provenientes de coletas realizadas por órgãos de vigilância sanitária e suas potências foram determinadas em relação ao 5º Padrão Internacional de Heparina - WHO 97/578.

Para ambos os ensaios, suas metodologias foram avaliadas comparando-se os resultados estatísticos da exatidão (determinada pela % de recuperação de uma diluição conhecida do 5º Padrão Internacional de Heparina em relação a ele mesmo) e pela repetibilidade ou precisão intra-ensaios (expressa pela variação nos resultados sob as mesmas condições de operação em um curto intervalo de tempo), sendo estes valores obtidos dividindo-se o desvio-padrão pela média, em relação às potências relativas das quatro repetições realizadas, em cada amostra, para ambos os métodos, através da determinação de seu coeficiente de variação (% CV).

Apenas para o ensaio TTPA, avaliamos a linearidade (determinada a cada ensaio, sendo um dos critérios para sua validação), sendo a amostra considerada satisfatória quando apresentou uma potência estimada em relação ao padrão, de no mínimo 90 % e no máximo 110 % da potência declarada — de acordo com os parâmetros estabelecidos para a solução de heparina no 5º fascículo da farmacopéia brasileira, 4ª edição e pela OMS em relação ao critério de validação de metodologias (WHO, 1997; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003).

6.3.1. Método da Inibição da Coagulação do Plasma Ovino (ICPO)

O ensaio foi realizado de acordo com o POP INCQS nº 65.3320.005 e a monografia descrita na Farmacopéia Brasileira, 4^o edição, parte 2, fascículo 5, 2003.

A potência da heparina foi calculada através de um ensaio biológico (ICPO) que compara o volume de uma solução amostra necessário para inibir a coagulação do plasma citratado de ovelha, recalcificado, com o volume da solução padrão de heparina necessário para produzir o mesmo efeito (com soluções padrão e amostra diluídas a mesma potência teórica).

Determina-se na prática, o volume do padrão e da amostra — na presença de 1 mL de plasma ovino citratado e 0,2 mL de cloreto de cálcio 1% (P/V), em tubos de ensaio 13 x 100 mm, após 1 hora de incubação a 37 °C em banho-maria — concedendo-se três graus (0,25; 0,5; 0,75) entre zero e a coagulação total (1,00), que permitem o grau de coagulação 0,5 procedendo-se o registro dos resultados no protocolo de resposta (tabela 1). Observando-se que, se a série das preparações não apresentar dois tubos com graduação acima de 0,50 e dois tubos com graduação abaixo de 0,50 — o ensaio será repetido, usando-se soluções padrão e amostra com potência teórica ajustada.

Tabela 1 — Protocolo de Respostas do ICPO

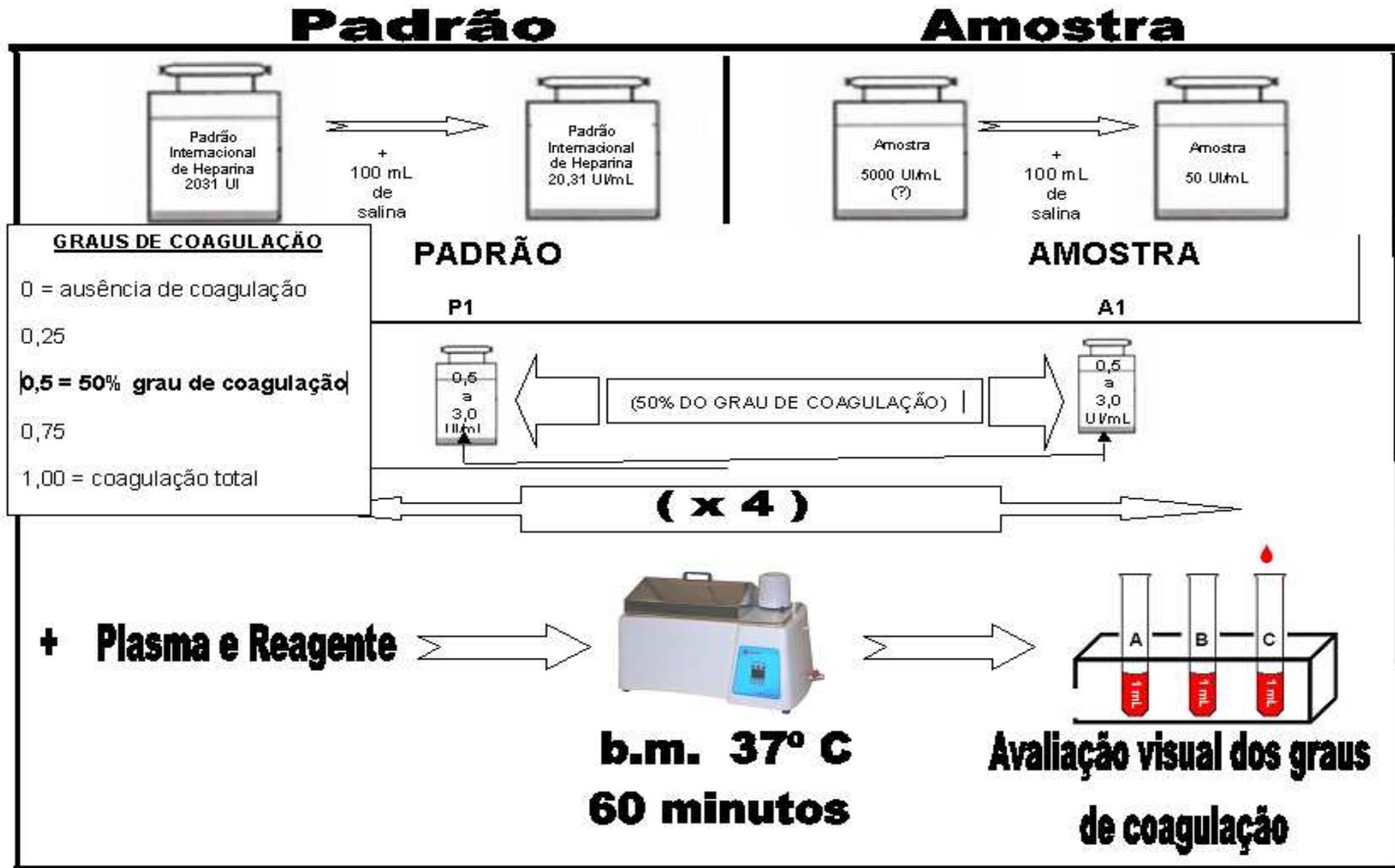
Tubo N°	Vol. Heparina (mL)	Vol.Salina (mL)	Log. vol x 10 X	Resposta de média pareada X_i	Graus de coagulação (Y)			
					Padrão		Amostra	
					Y	Y_i	Y	Y_i
1	0,8	0	0,9031	--				
2	0,78	0,02	0,8921	0,892				
3	0,76	0,04	0,8808	0,8807				
4	0,74	0,06	0,8692	0,8691				
5	0,72	0,08	0,8573	0,8572				
6	0,7	0,1	0,8451	0,845				
7	0,68	0,12	0,8325	0,8324				
8	0,66	0,14	0,8195	0,8194				
9	0,64	0,16	0,8062	0,806				
10	0,62	0,18	0,7924	0,7922				

Fonte: Adaptado do POP/INCQS n° 65.3320.005

No ensaio biológico da heparina pelo método ICPO (figura 5), o intervalo entre o volume que permite a coagulação e aquele que a inibe é tão pequeno, que a curva dose-resposta não pode ser determinada diretamente. Utiliza-se neste caso, a interpolação do logaritmo do volume (x) correspondente a 50% da coagulação, tanto para o padrão quanto para a amostra. Sendo empregada para a análise dos resultados experimentais, determinação da potência e limites de confiança, análise estatística para o modelo de delineamento de médias móveis (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003).

Figura 5 – Esquema do Ensaio ICPO

Ensaio ICPO

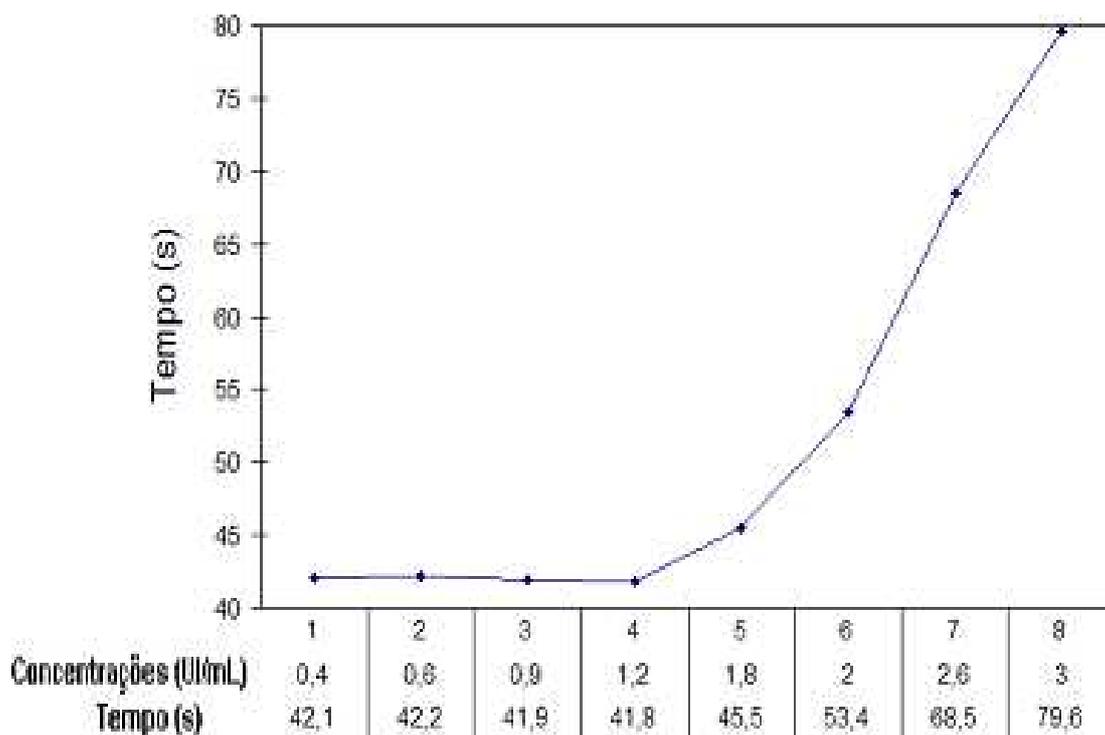


6.3.2. Método do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)

O ensaio foi realizado de acordo com a monografia descrita na Farmacopéia Brasileira, 4^o edição, parte 2, fascículo 5, 2003 — com exceção da utilização do plasma ovino citratado, que não apresentou resultados satisfatórios, sendo portanto, substituído por plasma humano padrão (MELO *et al.*, 2008).

Com base na região linear da curva dose-resposta elaborada com o 5^o Padrão Internacional de Heparina (gráfico 1), selecionaram-se as concentrações: 2,0, 2,6 e 3,0 UI/mL.

Gráfico 1 — Curva Dose-Resposta de Heparina pelo Método TTPA



Foram incubados em 6 tubos de ensaio 13 x 100 mm por 15 minutos, a 37 °C, 120 µL de plasma humano citratado liofilizado e 120 µL das respectivas soluções de heparina padrão e amostra (A1, A2, A3; P1, P2, P3). O plasma humano citratado liofilizado foi reconstituído com 1000 µL de água deionizada, seguindo as instruções do fabricante.

Foram transferidas duas alíquotas de 100 µL de cada tubo de ensaio (duplicatas) para as cubetas de polietileno do coagulômetro (com manutenção da temperatura a 37 °C) e adicionados 50 µL de cefalina ativada. Após exatos 120 segundos foram acrescentados 50µL da solução de CaCl₂ 25 mM e o tempo de coagulação registrado. Todo o procedimento anterior foi repetido usando novas soluções padrão e amostra, outra alíquota de plasma, com incubação e ativação em ordem inversa a anterior (P1, P2, P3; A1, A2, A3).

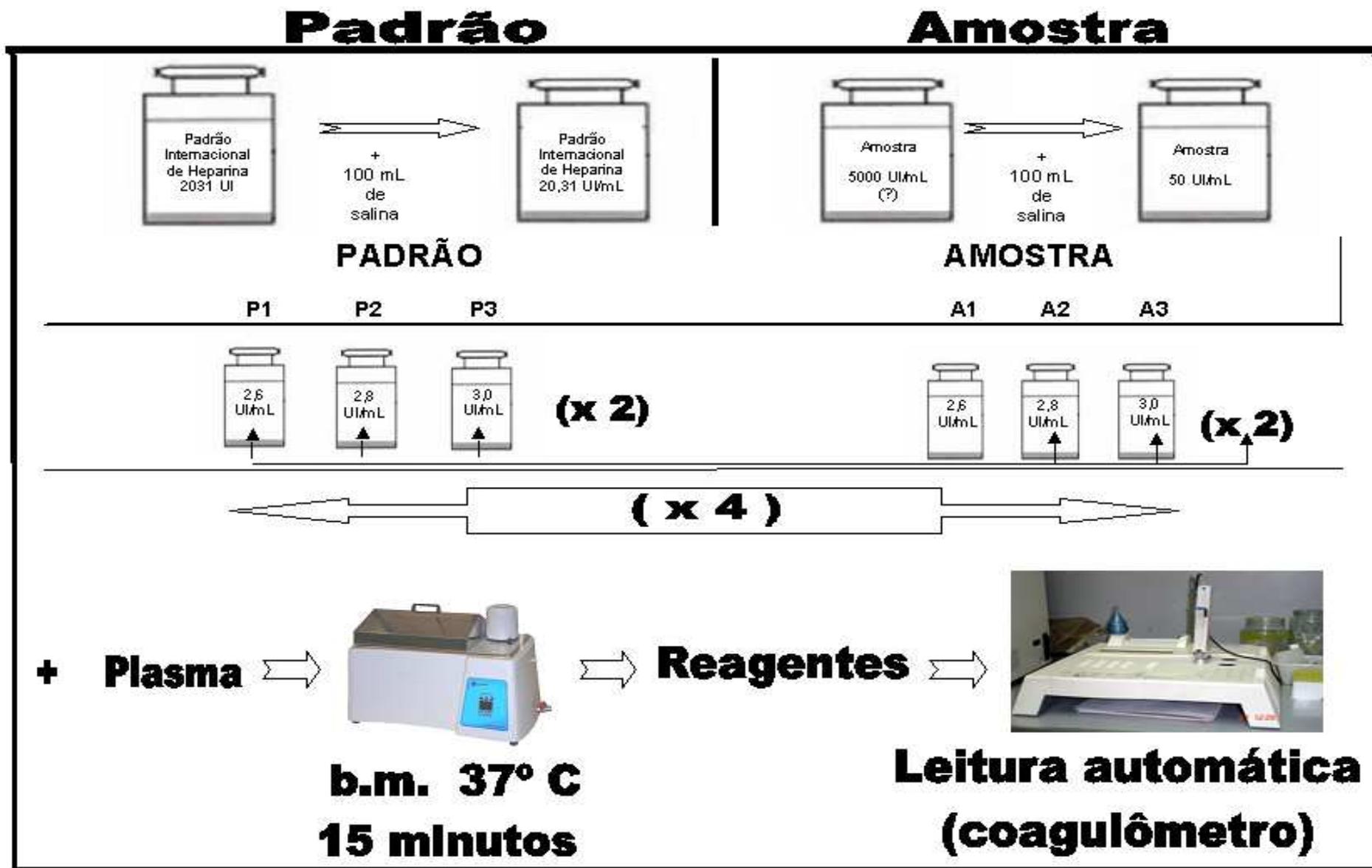
Para a análise dos resultados experimentais e a determinação da potência das amostras — para o método de análise de linhas paralelas em questão (ensaio 3 + 3 doses) foi realizada análise de variância. A validade de cada ensaio foi testada e a potência de cada amostra estimada através de análise estatística para o modelo de delineamento totalmente ao acaso.

As condições de validade foram avaliadas através da análise dos resultados de regressão; desvio de paralelismo e de desvio de linearidade (análise de curvatura quadrática e diferença de curvatura quadrática).

Toda a análise estatística foi realizada pelo Programa CombiStats® versão 4.0 da European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008).

Figura 6 – Esquema do Ensaio TTPA

Ensaio TTPA



7. RESULTADOS

7.1. Critérios de Comparação Analítica

O TTPA teve seus critérios de repetibilidade e precisão comparados analiticamente em relação ao ICPO para a determinação da potência biológica de heparinas não-fracionadas, conforme demonstrados nas tabelas 2 a 8 e no gráfico 1.

Tabela 2. Resultados ICPO x TTPA – Padrão (Potência Conhecida)

ICPO					
ENSAIO	RESULTADOS (%)	CV	POTÊNCIA \bar{x}	REFERÊNCIA	CONCLUSÃO
1	100,00	0,0 %	20,31 UI/ mL	20,31UI/mL 100 %	SATISFATÓRIA
2	100,00		100,00 % (90,00 a 110,00 %)	Potência: 90 a 110 %	
3	100,00			IC (80 a 120 %)	
4	100,00			P = 0,05	
TTPA					
ENSAIO	RESULTADOS (%)	CV	POTÊNCIA \bar{x}	REFERÊNCIA	CONCLUSÃO
1	97,90 (80,40 a 118,80 %)	1,9 %		20,31UI/mL 100 %	SATISFATÓRIA
2	101,00 (84,50 a 121,60 %)		20,23 UI/mL	Potência: 90 a 110 %	
3	97,70 (86,10 a 110,30 %)		99,60 % (92,10 a 107,60 %)	IC (80 a 125 %)	
4	101,10 (83,70 a 122,40 %)			P = 0,05	

Teste de Mann-Whitney : p-valor (bilateral-nível de significância 0,05) = 0,5000

CV = Coeficiente de Variação \bar{x} = Média Aritmética IC = Intervalo de Confiança P = Probabilidade

Tabela 3. Resultados ICPO x TTPA - Produtor 1 (Amostra de Referência)

– Heparina de Origem Suína –

ICPO					
ENSAIO	RESULTADOS (%)	CV	POTÊNCIA \bar{x}	REFERÊNCIA	CONCLUSÃO
1	100,00	2,0 %	5148,67 UI/ 0,25 mL	5000 UI/ 0,25 mL 100 % Potência: 90 a 110 % IC (80 a 120 %) P = 0,95	SATISFATÓRIA
2	104,54				
3	103,70				
4	103,70				
TTPA					
ENSAIO	RESULTADOS (%)	CV	POTÊNCIA \bar{x}	REFERÊNCIA	CONCLUSÃO
1	101,53 (89,39 a 115,45 %)	2,5 %	5192,31 UI/ 0,25 mL	5000 UI/ 0,25 mL 100 % Potência: 90 a 110 % IC (80 a 125 %) P = 0,95	SATISFATÓRIA
2	105,97 (93,11 a 121,54 %)				
3	107,67 (92,40 a 126,50 %)				
4	105,75 (84,16 a 136,18 %)				

Teste de Mann-Whitney : p-valor (bilateral-nível de significância 0,05) = 0,0745

CV = Coeficiente de Variação \bar{x} = Média Aritmética IC = Intervalo de Confiança P = Probabilidade

Obs.: Foi utilizado como medicamento de referência a heparina Lique mine® do Laboratório Roche.

Tabela 4 . Resultados ICPO x TTPA - Produtor 2

– Heparina de Origem Suína –					
ICPO					
ENSAIO	RESULTADOS (%)	CV	POTÊNCIA \bar{x}	REFERÊNCIA	CONCLUSÃO
1	107,40	1,8 %	5230,82 UI /0,25 mL 104,62 % (101,77 a 107,58 %)	5000 UI/ 0,25 mL 100 % Potência: 90 a 110 % IC (80 a 120 %) P = 0,95	SATISFATÓRIA
2	103,70				
3	103,85				
4	103,56				
TTPA					
ENSAIO	RESULTADOS (%)	CV	POTÊNCIA \bar{x}	REFERÊNCIA	CONCLUSÃO
1	97,70 (80,20 a 118,70 %)	1,8%	4994,08 UI/ 0,25 mL 99,88 % (92,44 a 10792 %)	5000 UI/ 0,25 mL 100 % Potência: 90 a 110 % IC (80 a 125 %) P = 0,95	SATISFATÓRIA
2	100,90 (84,40 a 121,50 %)				
3	98,30 (86,50 a 111,20 %)				
4	101,40 (83,90 a 122,80 %)				
Teste de Mann-Whitney : p-valor (bilateral-nível de significância 0,05) = 0,0105					
CV = Coeficiente de Variação \bar{x} = Média Aritmética IC = Intervalo de Confiança P = Probabilidade					

Tabela 5. Resultados ICPO x TTPA - Produtor 3

– Heparina de Origem Bovina –

ICPO					
ENSAIO	RESULTADOS (%)	CV	POTÊNCIA \bar{x}	REFERÊNCIA	CONCLUSÃO
1	107,40	0,35 %	5385,43 UI/ mL 107,71 % (106,52 a 108,9 %)	5000 UI/ mL 100 % Potência: 90 a 110 % IC (80 a 120 %) P = 0,95	SATISFATÓRIA
2	108,01				
3	107,40				
4	108,01				
TTPA					
ENSAIO	RESULTADOS (%)	CV	POTÊNCIA \bar{x}	REFERÊNCIA	CONCLUSÃO
1	112,00 (106,00 a 124,20 %)	3,2 %	5349,33 UI/ mL 107,00 % (104,30 a 110,40 %)	5000 UI/ mL 100 % Potência: 90 a 110 % IC (80 a 125 %) P = 0,95	SATISFATÓRIA
2	107,20 (103,30 a 112,90 %)				
3	104,00 (98,50 a 112,00 %)				
4	105,70 (102,00 a 110,80 %)				

Teste de Mann-Whitney : p-valor (bilateral-nível de significância 0,05) = 0,1241

CV = Coeficiente de Variação \bar{x} = Média Aritmética IC = Intervalo de Confiança P = Probabilidade

Tabela 6. Resultados ICPO x TTPA - Produtor 4

– Heparina de Origem Suína –					
ICPO					
ENSAIO	RESULTADOS (%)	CV	POTÊNCIA \bar{x}	REFERÊNCIA	CONCLUSÃO
1	105,46	1,2 %	5331,45 UI/ 0,25 mL 106,63 % (104,69 a 108,6 %)	5000 UI/ 0,25 mL 100 % Potência: 90 a 110 % IC (80 a 120 %) P = 0,95	SATISFATÓRIA
2	107,70				
3	105,68				
4	107,70				
TTPA					
ENSAIO	RESULTADOS (%)	CV	POTÊNCIA \bar{x}	REFERÊNCIA	CONCLUSÃO
1	105,50 (101,30 a 111,60 %)	2,7 %	5445,61 UI/ 0,25 mL 108,90 % (105,10 a 114,60 %)	5000 UI/ 0,25 mL 100 % Potência: 90 a 110 % IC (80 a 125 %) P = 0,95	SATISFATÓRIA
2	112,30 (108,20 a 118,60 %)				
3	107,40 (96,00 a 213,00 %)				
4	110,30 (103,10 a 128,70 %)				
Teste de Mann-Whitney : p-valor (bilateral-nível de significância 0,05) = 0,1932					
CV = Coeficiente de Variação \bar{x} = Média Aritmética IC = Intervalo de Confiança P = Probabilidade					

Tabela 7 . Resultados ICPO x TTPA - Produtor 5

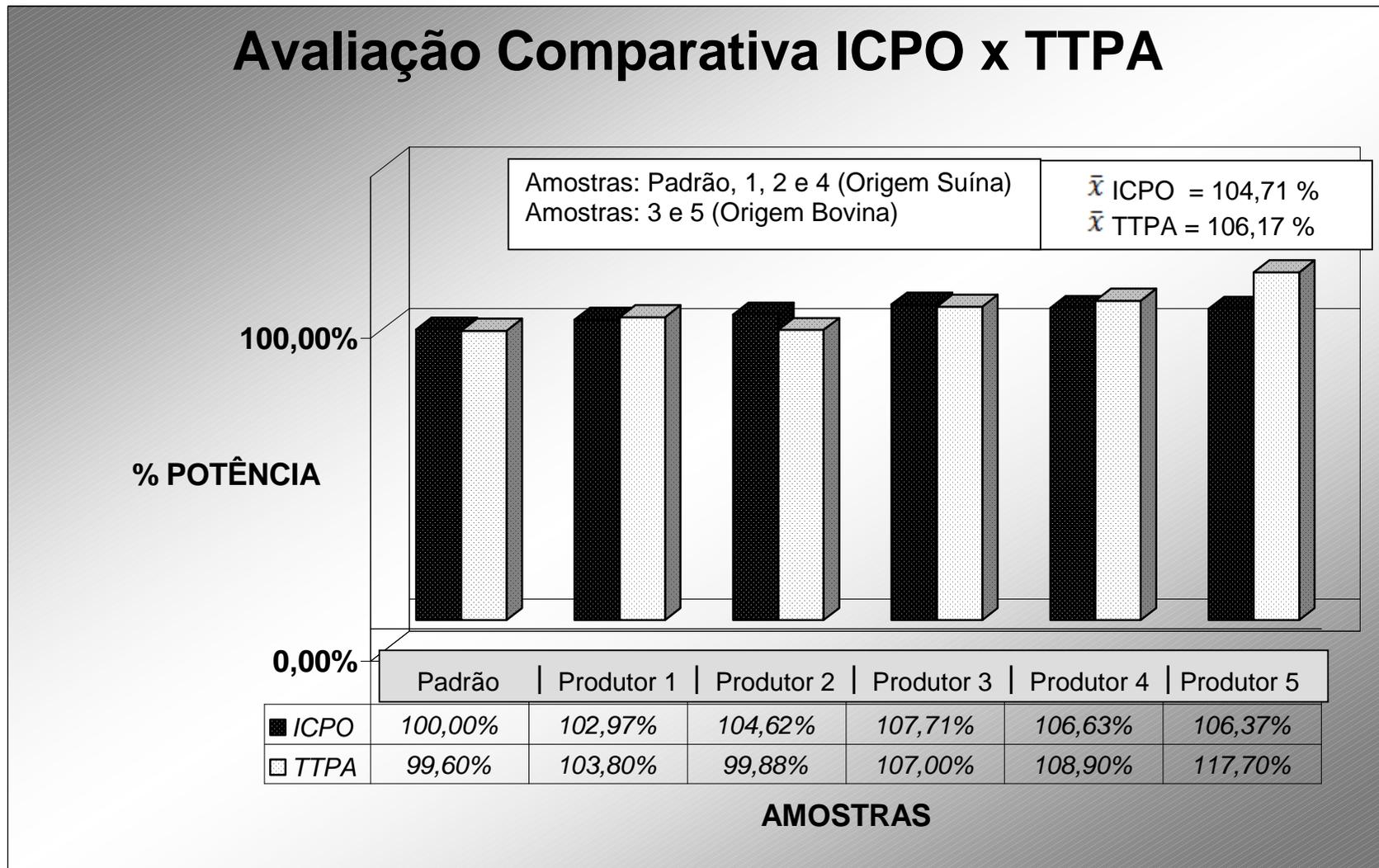
– Heparina de Origem Bovina –

ICPO					
ENSAIO	RESULTADOS (%)	CV	POTÊNCIA \bar{x}	REFERÊNCIA	CONCLUSÃO
1	106,26	0,1 %	5318,57 UI/ mL 106,37 % (105,71 a 107,04 %)	5000 UI/ mL 100 % Potência: 90 a 110 % IC (80 a 120 %) P = 0,95	SATISFATÓRIA
2	106,68				
3	106,26				
4	106,26				
TTPA					
ENSAIO	RESULTADOS (%)	CV	POTÊNCIA \bar{x}	REFERÊNCIA	CONCLUSÃO
1	123,90 (115,70 a 141,60 %)	4,98 %	5883,41 UI/ mL 117,70 % (112,40 a 126,50 %)	5000 UI/ mL 100 % Potência: 90 a 110 % IC (80 a 125 %) P = 0,95	INSATISFATÓRIA
2	116,90 (108,30 a 143,00 %)				
3	111,00 (105,50 a 121,10 %)				
4	122,60 (115,40 a 136,80 %)				

Teste de Mann-Whitney : p-valor (bilateral-nível de significância 0,05) = 0,0105

CV = Coeficiente de Variação \bar{x} = Média Aritmética IC = Intervalo de Confiança P = Probabilidade

Gráfico 2. Resultados ICPO x TTPA



7.2. Avaliação Estatística

Em uma amostragem estatística, o simples fato de um experimento poder apresentar variáveis contínuas ou discretas, constitui um fator de seleção para a indicação de diferentes grupos de testes. Neste trabalho optamos por aplicar os testes de hipótese paramétricos F da análise de variância (ANOVA) e t de Student, além do teste de hipótese não paramétrico de Mann-Whitney, já que o ensaio ICPO — por caracterizar-se pela leitura visual (qualitativa) dos graus de coagulação (0, 25, 50, 75 e 100%) — apresenta uma variável discreta, enquanto que o ensaio TTPA apresenta uma variável contínua, caracterizada pela leitura quantitativa de seus resultados (em segundos) obtidos no coagulômetro (SIEGEL & CASTELLAN, 2006).

7.2.1. Precisão dos Métodos

Através da repetição dos ensaios analíticos que expressaram a variação nos resultados sob as mesmas condições de operação, observamos que o método ICPO apresentou precisão superior (CV entre 0,0 % e 2,0 %) em relação ao método TTPA (CV entre 1,80 % e 4,98 %), mas mesmo assim podemos considerar o TTPA preciso, pois seus valores de CV foram baixos (DALMORA *et al*, 2005; MOURA, 2008; DALMORA *et al*, 2009; MOURA, 2009).

7.2.2. Exatidão

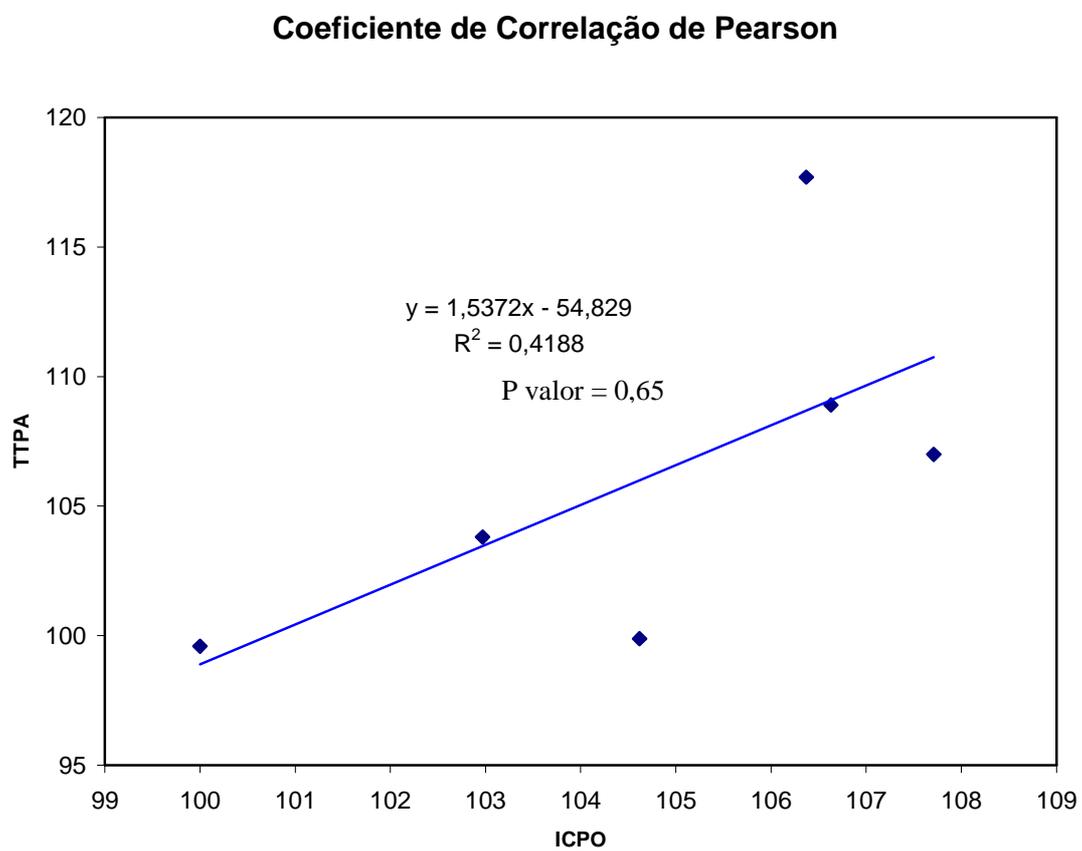
Ambas as metodologias foram comparadas com o 5º Padrão Internacional de Heparina em relação a ele mesmo e os resultados (100 % ICPO e 99,60 % TTPA) apontaram como capazes de descrever com exatidão o valor da potência biológica de heparina (DALMORA *et al*, 2005; MOURA, 2008; DALMORA *et al*, 2009; MOURA, 2009).

7.2.3. Validação da Metodologia TTPA

A análise do coeficiente de correlação de Pearson, entre as metodologias ICPO e TTPA (valor 0,65) indica uma correlação moderada entre os ensaios (gráfico 3), provavelmente devido à técnica de leitura subjetiva do ensaio ICPO, comparado a uma leitura automatizada do ensaio TTPA, que apresenta uma gama maior de possibilidades de resultados e provavelmente alcançará valores maiores se, a partir dos dados deste trabalho, um número maior de comparações for feito (SANTOS, 2007).

Com base no coeficiente de correlação de Pearson, nos valores de % de recuperação, do CV e dos cálculos estatísticos ANOVA, Teste de Grubs, Teste t e Teste de Mann-Whitney, além do medicamento de referência apresentar resultado 100 %, o ensaio TTPA apresentou uma variação satisfatória de acordo com os padrões adotados pela farmacopéia brasileira e pela OMS, podendo ser considerado validado (WHO, 1997; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003; DALMORA *et al*, 2005; MOURA, 2008; DALMORA *et al*, 2009; MOURA, 2009).

Gráfico 3. Correlação dos Resultados ICPO x TTPA



8. DISCUSSÃO

Atualmente o mercado mundial de heparinas apresenta um quadro extremamente complexo. A necessidade de um rigor crescente na análise das preparações de HNF (sobretudo nos EUA e na Europa) pode estimular produtores de países orientais a enviarem preparações de baixa qualidade para países pouco rigorosos em relação ao controle da qualidade destes produtos e fatos recentes no cenário mundial relacionados aos efeitos adversos referentes à utilização de heparina, foram atribuídos à contaminação de suas preparações pelo sulfato de condroitina (CAVALHEIRO FILHO, 2008; WHO, 2008; KISHIMOTO *et al.*, 2008).

A necessidade da implantação do TTPA para a avaliação da potência de heparinas apresenta uma série de justificativas. Uma delas é que, além de ser farmacopéico, este ensaio apresenta a vantagem de ser quantitativo, ou seja, pode ser realizado em um único dia, pois a medida do tempo para a formação de coágulos é realizada em coagulômetro, enquanto que o ICPO é qualitativo e leva em média cinco dias para sua conclusão, por adotar a observação visual e subjetiva da formação de coágulos.

Outro fator importante é que o TTPA é prescrito pela área médica na determinação da dosagem de heparinas a serem utilizadas nos pacientes e a maioria dos laboratórios produtores no Brasil realiza sua avaliação da potência através deste método e não pelo ICPO (possivelmente pelos motivos anteriormente citados), o que certamente tem levado a divergências técnicas e conseqüentemente variações nos resultados encontrados nos órgãos de vigilância sanitária — que utilizam apenas o ICPO como parâmetro analítico — sobretudo em situações de amostra única ou em casos de análise de contra-prova.

Os pesquisadores afirmam que as heparinas são comprovadamente seguras para uso clínico, porém especialistas da área médica relatam reações adversas relacionadas à sua origem. De acordo com DRYJSKI & DRYJSKI, 1996 e GOMES & BRAILE, 2009 a heparina de origem bovina é mais reatogênica

que a suína, evidenciando clara diferença em relação a seus efeitos adversos, havendo também a necessidade de reajuste de dose e monitoração mais acurada quando da mudança do produto. Apesar de nossos resultados analíticos não apresentarem diferenças inter-ensaios significativas, estudos de ROBINSON & LEWIS, 1999; FRANCIS *et al*, 2003 sugerem que as heparinas fabricadas a partir de vísceras de suínos devem ser a escolha ideal para utilização em cirurgias com circulação extra-corpórea (CEC), por serem mais toleradas pelos pacientes devido à qualidade da matéria-prima. Tal conclusão conseqüentemente evitará problemas futuros em relação aos eventos adversos diretamente associados às dosagens das heparinas.

Como parâmetro de comparação numérica dos resultados finais dos ensaios ICPO e TTPA, aplicamos os testes t de Student e F da análise de variância (ANOVA) ($p = 0,27$ e $p = 0,23$, respectivamente), não utilizando as prerrogativas estatísticas habituais pois, como mencionado anteriormente, suas metodologias não são paramétricas. Mesmo assim, ao encontrarmos os valores de $p > \alpha$ (0,05), demonstramos que os resultados obtidos em cada metodologia não são estatisticamente diferentes.

O teste de hipótese não paramétrico de Mann-Whitney — aplicado em cada um dos sistemas ICPO e TTPA — demonstrou que o 5º Padrão Internacional de Heparina, a amostra de referência, o produtor 3 e o produtor 4 (tabelas 2, 3, 5 e 6, nas páginas 31 a 35, respectivamente) apresentaram um p valor maior que 0,05 demonstrando que os ensaios não são estatisticamente diferentes.

As amostras dos produtores 2 e 5 (tabelas 4 e 7, nas páginas 33 e 36, respectivamente), apesar de satisfazerem os critérios de validação dos ensaios, apresentaram um p valor menor que 0,05, demonstrando que os referidos sistemas são estatisticamente diferentes. Este fato pode ser explicado pela variação de pesos moleculares das amostras estudadas (originárias de produtores diferentes), como descrito por MELO *et al.*, em 2008. Estes autores afirmam que o peso molecular das preparações de heparina influencia diretamente no TTPA e que frações de peso molecular menores são menos

sensíveis a este ensaio. Estas observações constituem alerta aos profissionais da área clínica para alterações nas doses deste fármaco, em relação aos seus efeitos colaterais.

Em relação aos ensaios analíticos, VACCARI *et al.* em 2003, relataram que o ICPO fornece resultados de potência significativamente superiores (média de 10%) quando comparados ao TTPA. Nossos resultados não reproduziram a conclusão deste estudo já que ao analisarmos os resultados inter-ensaios, observamos que os mesmos não apresentaram diferença significativa, pois ao considerarmos todos os seis ensaios (\bar{x} 104,72 % e \bar{x} 106,15 %, respectivamente), o TTPA apresentou 1,43 % a mais que o ICPO e quando consideramos apenas os quatro ensaios estatisticamente iguais (\bar{x} 104,39 % e \bar{x} 103,90 %, respectivamente), o TTPA apresentou 0,5 % a mais que o ICPO, com a precisão do TTPA apresentando um coeficiente de variação entre 1,8 % a 4,98 %, bem maior que o ICPO (0,1 % a 2,0 %), possivelmente devido a escala de leitura do ICPO ser menor (graus de coagulação) que o TTPA (tempos de coagulação).

9. CONCLUSÕES

Em relação aos resultados analíticos, o ICPO mostra-se exato e preciso, podendo continuar a ser utilizado normalmente pelos laboratórios de controle da qualidade das HNF.

O TTPA é um ensaio mais sensível que o ICPO e também deve ser adotado — conforme preconiza a farmacopéia brasileira — pelos laboratórios de controle, para ser utilizado paralelamente como parâmetro analítico.

Quanto à avaliação da metodologia TTPA, o ensaio apresentou uma variação satisfatória de acordo com os padrões adotados pela WHO e pode ser considerado validado.

Reforçados pela confiança na análise laboratorial – ferramenta essencial para a detecção de alterações da qualidade – relacionadas à avaliação comparativa proposta neste trabalho e através da utilização de parâmetros estatísticos, demonstramos claramente que o TTPA é a metodologia mais segura para uso nos laboratórios de controle da qualidade.

Consideramos que as HNF com matéria-prima de qualidade, pureza química garantida e isenção de contaminantes, reproduzem resultados equivalentes pelas duas metodologias.

Entendemos que os resultados deste estudo fortalecerão o estabelecimento de uma regulamentação específica para a análise de preparações de heparina por métodos mais modernos e apropriados.

Observamos a importância da padronização dos procedimentos de desenvolvimento de novas metodologias e de harmonização que assegurarão a qualidade e eficácia clínica das HNF.

Por fim, consideramos que deve ser estimulada aos produtores, a melhoria no controle da qualidade da produção das heparinas disponibilizadas no mercado, incentivando, paralelamente, a avaliação clínica por meio de critérios quantitativos das heparinas utilizadas na rede hospitalar e principalmente através das ações de Vigilância Sanitária, com a implementação de um sistema de notificação, tanto na rede pública, como na rede privada do Brasil.

REFERÊNCIAS

ANDREO FILHO, Newton. Desafios na qualidade de heparinas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.5, p. 306-307, 2009.

AVALIAÇÃO da Potência da Heparina Sódica – Método de Determinação do Grau de Inibição da Coagulação. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10 (65.3320.005).

BALLS, M.; FENTEM J. H. The Validation and Acceptance of Alternatives to Animal Testing. **Toxicology in Vitro**, v. 13, Iss. 4-5, p. 837-846, 1999.

BARROSO R. C. et al. Avaliação da protamina na neutralização da heparina após circulação extracorpórea. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v.17, n.1 p. 54-60, 2002.

BONEU, B. Low Molecular Weight Heparins: Are They Superior to Unfractionated Heparins to Prevent and to Treat Deep Vein Thrombosis? **Thrombosis Research**. v. 100, p. V113–V120, 2000.

BRASIL. Decreto nº 79.094, de 5 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros.

BRASIL. Ministério da Saúde/Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Manual de Coleta de Amostras de Produtos Sujeitos à Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 1998.

CARLOS, M. M. L.; FREITAS, P. D. F. S. Estudo da cascata de coagulação sangüínea e seus valores de referência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.1, n.2, p.49-55, 2007.

CATANI R.; BERTINI J. R. A.; PESSA C. J. N.; GOMES W. J.; LOUREÇO D. M.; NADER H. B.; DIETRICH C. B.; BRANCO J. N. R.; BUFFOLO E. Heparina de alto peso molecular. Uma alternativa nas operações com circulação extracorpórea: estudo experimental. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. 2001; n.16, v. 2, p. 160-170, 2001.

CAVALHEIRO FILHO, C.; CHAMONE, D. A. F.; RACHED, R. A.; MAFFEI, F. H. Heparinas: momento atual. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 54, n. 6, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302008000600001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 15 de junho de 2009.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention [online]. Epidemiologic notes and reports of acute allergic reactions associated with reprocessed hemodialyzers. Virginia, 2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001524.htm>. Acesso em 31 de julho de 2009.

CROWTHER, M. A.; SPITZER, K.; JULIAN, J.; GINSBERG, J.; JOHNSTON M.; CROWTHER R.; LASKIN, C. Pharmacokinetic profile of a low-molecular weight heparin (Reviparin) in pregnant patients: a prospective cohort study. **Thrombosis Research**, n. 98, p. 133–138, 2000.

COHEN, M.; ANTMAN, E. M.; GURFINKEL, E. TURPIE A. G. .G.; FURST J.; BIGONZI F.; RADDLEY . Impact of enoxaparin low molecular weight heparin in patients with Q-wave myocardial infarction. **The American Journal of Cardiology**, v. 86, is.5, p. 553-556. 2000.

DALMORA, S. L.; JUNIOR, L. B; VACCARI, S. F.; FRONZA, M., OLIVEIRA, P. R., ROLIM C. M. B. . Validation of the anti-factor IIa assay and potency assessment of enoxaparin in pharmaceutical formulations. **Elsevier. Il Farmaco** 60 p. 225–229, 2005.

DALMORA S. L.; SOUTO R. B.; SILVA L. M.; LANA A. D.; SCHUTKOSKI R; VACCARI S. F. Biological potency evaluation and physicochemical characterization of unfractionated heparins. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.5, p.326-332, 2009.

DRYJSKI M.; DRYJSKI H. Heparin induced thrombocytopenia. **The European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**. v.11, n.3; p. 260-269, 1996.

DUBOSCQ, C.; KORDICH, L. Efecto de la concentración de citrato de sodio sobre las pruebas de hemostasia. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v.39, n.1, p.87-92, 2005.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Council of Europe [online] – EDQM. CombiStats v. 4.0. disponível em <http://www.combistat.eu/>. Acesso em 10 de setembro de 2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Atheneu**, São Paulo, ed. 4, Parte II, fasc. 5, 2003.

FDA. Food and Drug Administration [online]. Information on Heparin [online]. Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/UCM112597>. Acesso em 31 de setembro de 2009.

FRANCIS, J. L.; PALMER III, G. J.; MORROOSE, R.; DREXLER, A. Comparison of bovine and porcine heparin in heparin antibody formation after cardiac surgery.

The Annals of Thoracic Surgery, v. 75, p. 17, 2003.

FRANCO, R. F. Fisiologia da Coagulação do Sangue e da Fibrinólise. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R., eds. Hematologia: Fundamentos e prática, **Atheneu**, São Paulo, cap. 65, p. 739-748, 2001.

FRAZIER J.M. Scientific criteria for validation of in vitro toxicity tests. OECD Environment Monograph Number 36. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), v. 36, p. 1–62, 1990.

GARCES, E. O.; VITORINO J. A.; VERONESE, F. V. Anticoagulação em terapias contínuas de substituição renal. **Revista da Associação Médica Brasileira** [online]. São Paulo, v. 53, n. 5, 2007. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0104-4230-2007-00500023&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 25 de junho de 2009.

GOMES, W. J; BRAILE, D. M. A busca de soluções para o problema das heparinas no mercado nacional. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v. 24, fasc. 2, 2009.

GOMES, W. J.; SABA, J. C.; BUFFOLO, E. 50 anos de circulação extracorpórea no Brasil: Hugo J. Felipozzi, o pioneiro da circulação extracorpórea no Brasil. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular** [on line], São José do Rio Preto, v. 20, n. 4, 2005 . Disponível em <http://www.scielo.Br/scielo.php?Script=sci_ar_text&pid=S0102-763820050004_00002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 25 de junho de 2009.

GUERRINI M.; BECCATI D.; SHRIVER Z.; NAGGI A., *et al.* Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. **Nature Biotechnology**. v. 26, p. 669–675, 2008.

HAMERSCHLAK, N.; ROSENFELD, L. G. M. Utilização da heparina e dos anticoagulantes orais na prevenção da trombose venosa profunda e da embolia pulmonar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, n. 03, v. 67, 1996.

HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C. Farmacologia Ilustrada. Porto Alegre: **Editora Artes Médicas**, ed. 2, 1998.

JIN, L.; ABRAHAMS, J. P.; SKINNER, R.; PETITOU, M.; PIKE, R. N.; CARRELL, R. W. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 14683–14688, 1997.

KISHIMOTO, T. K.; VISWANATHAN, K.; GANGULY, T.; ELANKUMARAN, S.; SMITH, S. Contaminated Heparin Associated with Adverse Clinical Events and Activation of the Contact System. **The New England Journal of Medicine**. n. 358 p. 2457-2467, 2008.

LONGHI F.; LAKS D.; KALIL N. G. N. Trombocitopenia induzida por heparina. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.23, n.2, p.93-99, 2001.

MAURO M. F. Z.; WANG R.; CRISTÓVÃOS. A. B.; SALMAN A. A.; OLIVEIRA J. B.; MANGIONE J A. Novos Inibidores da Trombina: Qual o Estado Atual das Pesquisas? **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v.12, n.3, p.130-137, 2004.

MEIRA, L. F. Capacidade para o trabalho, fatores de risco para as doenças cardiovasculares e condições laborativas de trabalhadores de uma indústria metal-mecânica de Curitiba. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

MELO, E. I.; PEREIRA, M. S. ; CUNHA, R.S.; SÁ M.P.L.; MOURÃO, P.A.S. Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 23, n. 2, p. 169-174, 2008.

MOURA W. C.; GALLINA N. M. F.; FUCHES R. M. M.; ROMIJN P. C.; LEITE J. P. G. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study. **Journal of Virological Methods**. v. 154 p. 7–13, 2008.

MOURA W. C. Aplicação do conceito dos Três Rs nos ensaios de Controle da Qualidade de imunobiológicos para Raiva. Dissertação de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Rio de Janeiro, 2009.

MUELLER, R.L.; SCHEIDT, S. History of drugs for thrombotic disease, discovery, development and directions for the future. **Circulation**, Dallas, v. 89, n.1, p. 432, 1994.

NIEHS. National Institute of Environmental Health Sciences [online]. Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods: A Report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. NIH Publication No. 3981, 1997. NIEHS, Research Triangle Park, North Carolina, U.S.A., Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/about_docs/validate.pdf> Acesso em 18 de janeiro de 2010.

NOTHENBERG, M. Heparina adulterada, mais um “negócio da china”. Química e Derivados [on line], São Paulo, n. 471, 2008. Disponível em <http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd471/biofarma/biofarma.html>. Acesso em 17 fev 2009.

ORTEL T. L.; GOCKERMAN J. P.; CALIFF R. M.; MCCANN R. L.; O'CONNOR C. M.; METZLER D. M.; GREENBERG C. S. Parenteral anticoagulation with the heparinoid Lomoparan (Org 10172) in patients with heparin induced thrombocytopenia and thrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v.67, n.3, p 292-296, 1992.

RITT L. E . F; FLATO U. P.; GUIMARÃES H. P.; AVEZUM A.; PIEGAS L. S. Antitrombóticos nas síndromes coronarianas agudas: diretrizes atuais e novas evidências. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 20, n.2, p. 165-172, 2008.

ROBINSON J. A.; LEWIS B. E. Plasmapheresis in the management of heparin-induced thrombocytopenia. **Seminars in Hematology**. v. 36, suppl. 1, p. 29-32, 1999.

ROBINSON J. Bioassays - A continuously developing field. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 15, p. 676-678, 2003.

ROZENFELD, Suely; COSTA, Ana Célia Pessoa da Silva. O Laboratório Oficial na Avaliação analítica. In: ROZENFELD, Suely (org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000.

SANTOS, Carla. Estatística descritiva – Manual de Auto-Aprendizagem. Lisboa. **Editora Sílabo**. 2007.

SBCCV. Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular. Boletim Científico Especial - Heparina 1 [online]. Disponível em http://www.sbccv.org.br/medica/boletim_esp08_01_heparina.asp. Acesso em 31 de julho de 2009.

SILVA K. R.; COSTA R.; RACHED R. A.; MARTINELLI FILHO M.; CALDAS J. G. M. P.; CARNEVALE F. C.; MOREIRA L. F. P.; STOLF N. A. G. Warfarin prevents venous obstruction after cardiac devices implantation in high-risk patients: partial analysis. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. v. 23, n. 4, p. 542-549, 2008.

SIEGEL, S.; CASTELLAN JÚNIOR, N.J. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. 2.ed. Porto Alegre: **Editora Artes Médicas**, 2006.

SOUZA, A. L. L. Prevalência da Hipertensão Arterial referida, percepção de sua origem e formas de controle em área metropolitana de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Saúde Pública/USP, São Paulo, 1999 [on line]. Disponível em <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/bvsSP/?IisS cript =lah/iah.xis&nextAction=lnk&base=TESESSP&lang=p&format=detailed.pftindexSearch=ID&exprSearch=247970>. Acesso em 10 de agosto de 2009.

TREJO I C. Anticoagulantes: Farmacología, mecanismos de acción y usos clínicos. Servicio de Medicina Interna, Hospital Base de Osorn. **Cuadernos de Cirugía**, v. 18, n. 1, p. 83-90, 2004.

UNITED States Pharmacopeia [on line]. Heparin Information. Disponível em: <http://www.usp.org/hottopics/heparin.html>. Acesso em 08 de agosto de 2009.

VACCARI S.F.; LIBERATO B.J.; MASIERO S.M.K.; FRONZA M.; DALMORA S. L. Avaliação comparativa da atividade biológica de heparinas não-fracionadas em produtos farmacêuticos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.25, n.2, p. 103-110, 2003.

WAINSTEIN, M. V.; RIBEIRO, J. P. Avaliação crítica da terapia antitrombótica: evidências, limitações e aplicabilidade clínica. **Aterosclerose**. v. 2, n. 4, p. 15-19, 2003.

WALENGA J. M., BICK R. L. Heparin-induced thrombocytopenia, paradoxical thromboembolism, and other side effects of heparin therapy. **Medical Clinics of North America**. v.82 n. 3 p. 635-58, 1998.

WALLENTIN L.; BERGSTRANDB L.; DELLBORG M.; FELLENIUS C., *et al.*; Low molecular weight heparin (dalteparin) compared to unfractionated heparin as an adjunct to rt-PA (alteplase) for improvement of coronary artery patency in acute myocardial infarction: the ASSENT Plus study. **European Heart Journal**, v. 24 p. 897-908, 2003.

WORLD Health Organization. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements, Part 2: Validation. Chp. 15 Validation of analytical assays [Press]. P. 65-69. Geneva, 1997.

_____. A WHO Manual STEPS de Acidentes Vasculares Cerebrais: enfoque passo a passo para a vigilância de acidentes vasculares cerebrais – 2005. Disponível em: <http://www.paho.org/portuguese/ad/dpc/nc/steps-stroke.pdf>. Acesso em 29 jul 2009.

_____. A WHO Newsletter of National Drug Regulatory Authorities (DRAs) and WHO have issued international alerts, warning letters to health professionals and information about recalls regarding contaminated heparin sodium injections – 2008. Disponível em: http://www.who.int/medicines/publications/newsletter/PN2008_2.pdf. Acesso em 30 de julho de 2009.

WIINBERG, B.; JENSEN, A. L.; KJELGAARD-HANSEN, M.; ROJKJAER, R.; JOHANSSON, P. I.; GADE, L. P.; GRAM, D. X.; KRISTENSEN, A. T. Study on biological variation of haemostatic parameters in clinically healthy dogs. **Veterinary Journal**, v.174, p.62-68, 2007.

WU, C. China records 155% increase in heparin sodium exports for Q1 [on line]. Disponível em: <http://www.asia-manufacturing.com/news-328-heparin-sodium-pharmaceuticalexports-shenzhenhepalinkbiotech-news2.html>. Acesso em 09 de dezembro de 2009.