

Avaliação comparativa da atividade biológica de heparinas não fracionadas pelas metodologias de inibição da coagulação do plasma ovino (ICPO) e de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

Comparative study on the biological activity of non-fractionated heparin by using sheep plasma coagulation inhibition assay (SPCIA) and activated partial thromboplastin time (APTT) methodologies

RIALA6/1504

Dalvim Pereira dos ANJOS^{1*}, André Vicente Plastino SILVA¹, Sergio Alves da SILVA², Wlamir Corrêa de MOURA³, Antonio Eugenio Castro Cardoso de ALMEIDA⁴

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Fisiopatologia, Setor de Patologia Clínica, Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ. Avenida Brasil, 4365. Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, CEP: 21040-900. Tel.: (21) 3865-5140. E-mail: dalvim.pereira@incqs.fiocruz.br

²Diretoria de Gestão da Qualidade, Coordenação do Programa da Qualidade, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ

³Laboratório de Vacinas Virais e Cultura de Células, Setor de Vacinas Virais, Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fiocruz

⁴Laboratório de Microbiologia de Produtos, Setor de Vacina Hib, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fiocruz

Recebido: 07.11.2011 – Aceito para publicação: 30.09.2012

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo comparativo entre os métodos ICPO e TTPA, para avaliar a eficácia da implantação do TTPA como método para a avaliação da segurança e eficácia de heparinas não fracionadas em produtos farmacêuticos. Foram avaliados, comparativamente, cinco lotes de diferentes fabricantes de heparinas não fracionadas (polissacarídeo sulfatado usado como droga anticoagulante), de origem suína ou bovina, testadas com base no 5º Padrão Internacional de Heparina. Esses produtos foram provenientes de coletas efetuadas pelas autoridades sanitárias para análise no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). As amostras foram analisadas quanto à pureza e potência anticoagulante, por meio de duas metodologias: inibição da coagulação do plasma ovino (ICPO) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA). Houve boa concordância entre as duas metodologias, sendo que a técnica TTPA apresentou ser mais simples, rápida e objetiva, quando da utilização do coagulômetro para a medição do tempo de formação de coágulos, em detrimento da leitura subjetiva dos graus de coagulação no ensaio de ICPO. A implantação e a execução do TTPA em paralelo à utilização do ICPO garantirão o aumento de sensibilidade técnica na avaliação da segurança e eficácia de heparinas não fracionadas.

Palavras-chave. heparinas não fracionadas, controle da qualidade, ICPO, TTPA, vigilância sanitária.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the methods of SPCIA and APTT to evaluate the effectiveness of the implementation of APTT as a method for assessing the safety and efficacy of unfractionated heparins in pharmaceuticals. Five lots of non-fractionated heparins (a sulfated polysaccharide used as anticoagulant) from porcine or bovine origin, and from different producers were comparatively evaluated. They were tested based on the 5th International Standard for Heparin, and they were collected by the Brazilian sanitary authorities for evaluating their purity and anticoagulant potency at the National Institute for Quality Control in Health (INCQS). Two methodologies were employed: sheep plasma coagulation inhibition assay (SPCIA) and activated partial thromboplastin time technique (APTT). An excellent correlation between the both methodologies was found, and it showed that technique is easier, faster and objective due to the use of a coagulometer for measuring the clot-forming time, instead of SPCIA assay which uses the subjective visual determination of the coagulation degree. The implementation and execution of APTT technique and the concomitant use of SPCIA assay will improve the technique sensitivity for assessing the non-fractionated heparins safety and efficacy.

Keywords. non-fractionated heparins, quality control, SPCIA, APTT, sanitary surveillance.

INTRODUÇÃO

A heparina, substância natural encontrada abundantemente nas vísceras de suínos e bovinos, é utilizada desde a década de 1930 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-mortalidade¹.

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 sanguíneo, já que a heparina atua tanto na trombina livre como na trombina ligada à fibrina, ativando a antitrombina III e, conseqüentemente, inibindo a coagulação^{2,3}.

Além disso, a meia vida curta e dependente da dose, bem como a disponibilidade de um antídoto específico (o sulfato de protamina) lhe confere propriedades adicionais de grande relevância. Essas características a tornam o segundo agente terapêutico natural mais utilizado no mundo, superado apenas pela insulina⁴.

É encontrada em duas apresentações clínicas: as Heparinas Não Fracionadas (HNF), com massas moleculares entre 4.000 e 6.000 Daltons, e as Heparinas de Baixo Peso Molecular (HBPM), com massas moleculares entre 4.000 e 6.000 Daltons^{5,6}.

Recentemente, sua demanda por avaliações de natureza fiscal aumentou devido à contaminação em seu processo de produção pela matéria-prima chinesa, sulfato de condroitina. Este fármaco não possui atividade anticoagulante, mas, quando quimicamente modificado por meio de supersulfatação, adquire essa característica, transformando-se em um mimético da heparina, não sendo detectável por metodologia analítica convencional. Esse fato promoveu um aumento das políticas globais de vigilância sanitária, com a elaboração de ações de controle da qualidade desde a sua etapa de produção⁷⁻¹².

A Inibição da Coagulação do Plasma Ovino (ICPO) e o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) são os 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 proteolítica¹³. As leituras da

reação final desses ensaios se estabelecem em tempos ou em graus de coagulação, relacionados ao 5º Padrão Internacional de heparina de mucosa intestinal suína¹⁴⁻¹⁶.

O ensaio ICPO, preconizado pela Farmacopeia Brasileira, tem sido amplamente adotado para a avaliação de potência das HNF. O TTPA (também preconizado pela Farmacopeia Brasileira) é o teste mais comumente empregado para a avaliação das vias intrínseca e comum do modelo *in vitro* da cascata proteolítica, além da monitoração do uso de heparinas clássicas (não fracionadas) em pacientes em tratamento anticoagulante¹⁵. No entanto, até o momento, apenas o ICPO está implantado, sendo realizado rotineiramente pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), unidade da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e órgão de referência para as questões normativas e analítico-laboratoriais vinculados à vigilância sanitária.

O objetivo deste trabalho é fazer um estudo comparativo entre os métodos ICPO e TTPA, para verificar a eficácia da implantação do TTPA, como método para a avaliação da segurança e eficácia de heparinas não fracionadas em produtos farmacêuticos.

MATERIAL E MÉTODOS

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 percentagem de recuperação de uma diluição conhecida do 5º Padrão Internacional de Heparina em relação a ele mesmo) e pela repetibilidade ou precisão intraensaios (expressa pela variação nos resultados sob as mesmas condições de operação em um curto intervalo de tempo), sendo esses 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, por meio da determinação de seu coeficiente de variação (CV), expresso como percentagem (%).

Apenas para o ensaio do 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 Farmacopeia Brasileira, 4ª edição, e pela OMS em relação ao critério de validação de metodologias^{14,17}.

Método da Inibição da Coagulação do Plasma Ovino (ICPO)

O ensaio foi realizado de acordo com o POP INCQS nº 65.3320.005¹⁸ e com a monografia descrita na Farmacopeia Brasileira, 4ª edição, parte 2, fascículo 5¹⁴.

A potência da heparina foi calculada por meio 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 à 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 × 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.

No ensaio biológico da heparina pelo método ICPO, 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, nesse 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 móveis¹⁴.

Método do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)

O ensaio foi realizado de acordo com a monografia descrita na Farmacopeia Brasileira, 4ª edição, parte 2, fascículo 5¹⁴, — com exceção da utilização do plasma ovino citratado, que não apresentou resultados satisfatórios, sendo, portanto, substituído por plasma humano padrão¹⁹.

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

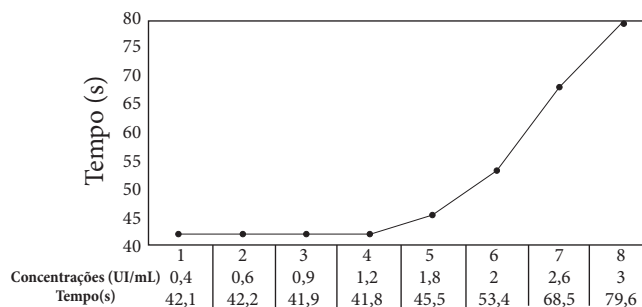


Figura 1. Curva Dose-Resposta de Heparina pelo Método TTPA

Foram incubados, em 6 tubos de ensaio 13 × 100 mm por 15 minutos, a 37 °C, 120 µL de plasma humano

Tabela 1. Protocolo de Respostas do Método ICPO

Tubo Nº	Vol.Heparina (mL)	Vol.Salina (mL)	Log vol x 10 x	Resposta de média pareada Xi	Graus de coagulação (Y)			
					Padrão		Amostra	
					Y	Yi	Y	Yi
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	0,8450				
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	0,8060				
10	0,62	0,18	0,7924	0,7922				

Adaptado de POP/INCQS nº 65.3320.005

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 1.000 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 50 µL 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 à 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 por meio de análise estatística para o modelo de delineamento totalmente ao acaso.

As condições de validade foram avaliadas por meio da análise dos resultados de regressão, desvio de paralelismo e 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)²⁰.

RESULTADOS

O TTPA teve seus resultados para repetibilidade e precisão comparados analiticamente em relação aos do ICPO para a determinação da potência biológica de heparinas não fracionadas, conforme demonstrados na Figura 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 coagulômetro²¹.

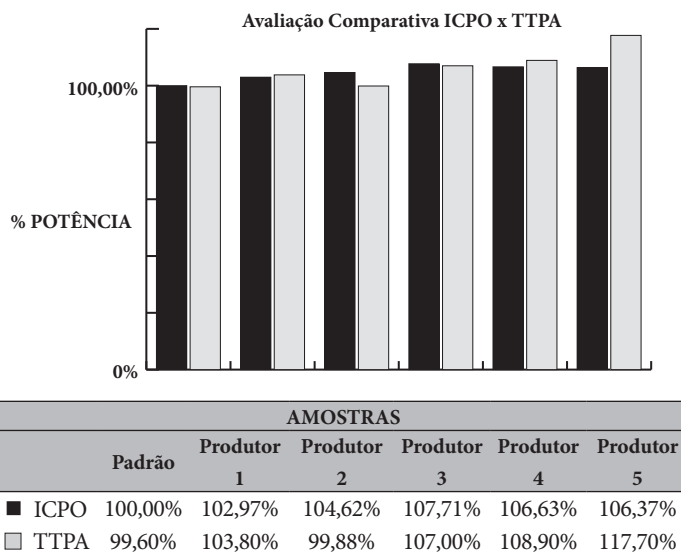


Figura 2. Resultados ICPO × TTPA

Precisão dos métodos

Por meio 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 baixos²²⁻²⁵.

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 heparina²²⁻²⁵.

Validação da metodologia TTPA

A análise do coeficiente de correlação de Pearson (*r*), entre as metodologias ICPO e TTPA (valor 0,65) indica uma correlação moderada entre os ensaios (Figura 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 feito²⁶.

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 Farmacopeia Brasileira e pela OMS, podendo ser considerado válido^{16,19, 22-25}.

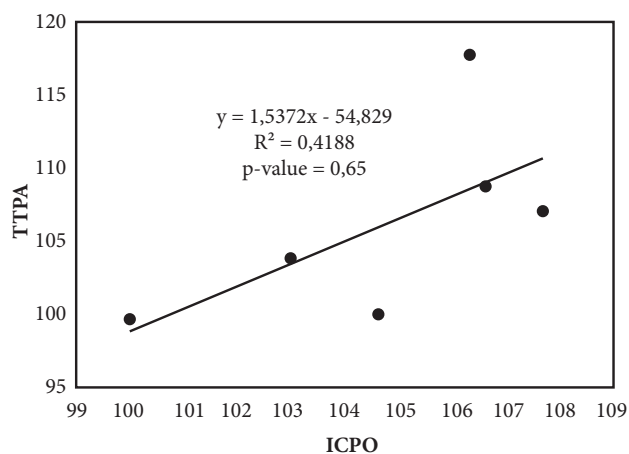


Figura 3. Correlação dos Resultados ICPO x TTPA

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 desses 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^{11,27,28}.

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 farmacopeico, 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 fabricantes no Brasil realiza sua avaliação da potência por meio desse método e não pelo ICPO (possivelmente pelos motivos anteriormente citados), o que certamente tem levado a divergências técnicas e, conseqüentemente, a 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 contraprova.

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 e Dryjski²⁹ e Gomes e Braile³⁰, 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 interensaios significativas, estudos de Robinson e Lewis³¹, Francis et al.³² sugerem que as heparinas fabricadas a partir de vísceras de suínos devem ser a escolha ideal para utilização em cirurgias com circulação extracorpórea (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.

Os parâmetros de comparação numérica dos resultados finais dos ensaios pelo ICPO e TTPA aplicados foram 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 são não paramétricas. Mesmo assim, ao encontrarmos os valores de $p > \alpha (0,05)$, demonstramos que os resultados obtidos em cada metodologia não são estatisticamente distintos.

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, 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, 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. Esse fato pode ser explicado pela variação de pesos moleculares das amostras estudadas (originárias de produtores diferentes), como descrito por Melo et al.¹⁹ em 2008. Esses 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. Essas observações constituem alerta aos profissionais da área clínica para alterações nas doses desse fármaco, em relação aos seus efeitos colaterais.

Em relação aos ensaios analíticos, Vaccari et al.¹⁵ relataram, em 2003, que o ICPO fornece resultados de potência significativamente superiores (média de 10%) quando comparados ao TTPA. Nossos resultados não reproduziram a conclusão desse estudo já que, ao analisarmos os resultados inter-ensaios, observamos que os mesmos não apresentaram diferença significativa, pois, ao considerarmos todos os seis ensaios (104,72% e 106,15%, respectivamente), o TTPA apresentou 1,43% a mais que o ICPO e, quando consideramos apenas os quatro ensaios estatisticamente iguais (104,39% e 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 à escala de leitura do ICPO ser menor (graus de coagulação) que o TTPA (tempos de coagulação).

CONCLUSÃO

Em relação aos resultados analíticos, o ICPO, por ser um método qualitativo, apresentou sensibilidade limitada em comparação com o TTPA (método quantitativo), o que não o impede de 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 pode ser adotado – conforme preconiza a Farmacopeia 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 por meio 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 fabricantes 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, por meio de ações da Vigilância Sanitária, com a implementação de um sistema de notificação tanto na rede pública como na rede privada do Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil; ao Ministério da Saúde e ao Dr. Ivano R. V. Filippis Capasso, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, pela revisão e sugestões da tradução em inglês.

REFERÊNCIAS

1. Silva KR, Costa R, Rached RA, Martinelli Filho M, Caldas JGMP, Carnevale FC, et al. Warfarin prevents venous obstruction after cardiac devices implantation in high-risk patients: partial analysis. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2008;23(4):542-9.
2. Gracher AHP. Avaliação do potencial anticoagulante e antitrombótico de polissacarídeos nativos e quimicamente sulfatados de basidomicetos [tese de doutorado]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, 2010.
3. Carvalho LCD. Inibidores seletivos da trombina, novo tratamento anticoagulante em doentes com fibrilação auricular. Aplicação do conceito dos três Rs nos ensaios de Controle da Qualidade de imunobiológicos para Raiva [tese de doutorado]. Porto. Universidade do Porto, 2011.
4. Harvey RA, Champe PC. *Farmacologia Ilustrada*. 2. ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 1998.

5. Mauro MFZ, Wang R, Cristóvão SAB, Salman AA, Oliveira JB, Mangione JA. Novos inibidores da trombina: qual o estado atual das pesquisas? *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2004;12(3):130-7.
6. Junqueira DRG, Viana GT, Peixoto ERM, Barros FCR, Carvalho MG. Farmacovigilância da heparina no Brasil. *Rev Assoc Med Bras*. 2011;57(3):328-32.
7. World Health Organization. A WHO Manual STEPS de acidentes vascular cerebrais: enfoque passo a passo para a vigilância de acidentes vascular cerebrais – 2005. [acesso 2012 Jul 29]. Disponível em: [<http://www.paho.org/portuguese/ad/dpc/nc/steps-stroke.pdf>].
8. Guerrini M, Beccati D, Shriver Z, Naggi A, Viswanathan K, Bisio A, et al. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nat Biotech*. 2008;26:669-75.
9. Nothenberg M. Heparina adulterada, mais um “negócio da china”. Química e Derivados [on-line], São Paulo, n. 471, 2008. [acesso 2012 fev 17]. Disponível em [<http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd471/biofarma/biofarma.html>].
10. Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular – SBCCV. Boletim Científico Especial – Heparina 1 [on-line]. [acesso 2012 jul 31]. Disponível em: [http://www.sbccc.org.br/medica/boletim_esp08_01_heparina.asp].
11. World Health Organization. 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. [acesso 2012 jul 30]. Disponível em: [http://www.who.int/medicines/publications/newsletter/PN2008_2.pdf].
12. Wu C. China records 155% increase in heparin sodium exports for Q1 [on-line]. [acesso 2012 jan 09]. Disponível em: [<http://www.asia-manufacturing.com/news-328-heparin-sodium-pharmaceuticalexports-shenzhenhepalinkbiotech-news2.html>].
13. Carlos MML, Freitas PDFS. Estudo da cascata de coagulação sanguínea e seus valores de referência. *Acta Vet Bras*. 2007;1(2):49-55.
14. Farmacopeia Brasileira. 4ª ed. Parte II, fasc. 5. São Paulo (SP): Atheneu, 2003.
15. Vaccari SF, Liberato BJ, Masiero SMK, Fronza M, Dalmora SL. Avaliação comparativa da atividade biológica de heparinas não-fracionadas em produtos farmacêuticos. *Rev Bras Hemat Hemot*. 2003;25(2):103-10.
16. United States Pharmacopeia. Heparin Information. [acesso 2012 ago 08]. Disponível em: [<http://www.usp.org/hottopics/heparin.html>].
17. World Health Organization. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements, Part 2: Validation. Chp. 15 Validation of analytical assays [Press]. Genebra; 1997. p. 65-9.
18. Avaliação da Potência da Heparina Sódica – Método de Determinação do Grau de Inibição da Coagulação. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro (RJ): INCQS/FIOCRUZ. Seção 10 (65.3320.005).
19. Melo EI, Pereira MS, Cunha RS, Sá MPL, Mourão PAS. Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2008;23(2):169-74.
20. European Pharmacopoeia. Council of Europe [online] – EDQM. CombiStats v. 4.0. [acesso 2011 jul 10]. Disponível em [<http://www.combistat.eu/>].
21. Siegel S, Castellan Júnior NJ. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. 2ª ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2006.
22. Dalmora SL, Junior LB, Vaccari SF, Fronza M, Oliveira PR, Rolim CMB. Validation of the anti-factor IIa assay and potency assessment of enoxaparin in pharmaceutical formulations. *Farmaco*. 2005;60(3):225–9.
23. Moura WC, Gallina NM F, Fuches RM M, Romijn PC, Leite JPG. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study. *J Virol Meth*. 2008;154:7-13.
24. Dalmora SL, Souto RB, Silva LM, Lana AD, Schutkoski R, Vaccari SF. Biological potency evaluation and physicochemical characterization of unfractionated heparins. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(5):326-32.
25. Moura WC. Aplicação do conceito dos Três Rs nos ensaios de Controle da Qualidade de imunobiológicos para Raiva [tese de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz, 2009.
26. Santos C. Estatística descritiva – Manual de Auto-Aprendizagem. Lisboa: Sílab; 2007.
27. Cavalheiro Filho C, Chamone DAF, Rached RA, Maffei FH. Heparinas: momento atual. *Rev Assoc Med Bras*. 2008;54(6). [acesso 2012 jun 15] Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302008000600001&lng=en&nrm=iso].
28. Kishimoto TK, Viswanathan K, Ganguly T, Elankumaran S, Smith S. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *New Engl J Med*. 2008;358:2457-67.
29. Dryjski M, Dryjski H. Heparin induced thrombocytopenia. *Vasc Endovasc Surg*. 1996;11(3):260-9.
30. Gomes WJ, Braile DM. A busca de soluções para o problema das heparinas no mercado nacional. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2009;17(2):167-8.
31. Robinson JA, Lewis BE. Plasmapheresis in the management of heparin-induced thrombocytopenia. *Semin Hematol*. 1999;36(1):29-32.
32. Francis JL, Palmer III GJ, Moroosse R, Drexler A. Comparison of bovine and porcine heparin in heparin antibody formation after cardiac surgery. *Ann Thoracic Surg*. 2003;75:17.