

Artigo/Article

Avaliação comparativa da atividade biológica de heparinas não-fracionadas em produtos farmacêuticos
Comparison of the biological activities of unfractionated heparins in pharmaceutical products

Silvana F. Vaccari
Liberato Brum Júnior
Silvia M. K. Masiero
Marcio Fronza
Sérgio L. Dalmora

Realizou-se a avaliação biológica de potência de heparinas convencionais contra o 5º Padrão Internacional de heparina suína pelos ensaios preconizados da inibição da coagulação do plasma ovino (ICPO), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e anti-fator Xa. Correlacionaram-se os resultados, demonstrando que o ICPO fornece potências em média 10,72%, significativamente superiores aos outros procedimentos. Analisou-se a influência de diferentes lotes de plasma sobre o resultado do ensaio do ICPO observando-se variação de até 7,32%. Como alternativa, padronizou-se o ensaio do anti-fator IIa e efetuou-se a determinação de potência das amostras obtendo-se valores reprodutíveis, comparáveis ao método do anti-fator Xa, que demonstram a viabilidade da inclusão como ensaio harmonizado para o controle da qualidade. Os resultados de potência, fornecidos lote a lote, em geral, cumprem as especificações farmacopéicas e demonstram a qualidade que garante a segurança e eficácia clínica dos medicamentos. Rev. bras. hematol. hemoter. 2003;25(2):103-110.

Palavras-chave: Heparinas; plasma ovino; anti-fator Xa; tempo de tromboplastina parcial ativada; anticoagulante; anti-fator IIa.

Introdução

As heparinas convencionais, não-fracionadas, são usadas clinicamente para profilaxia e tratamento de trombose venosa, devido às suas propriedades anticoagulantes. Recentemente foram desenvolvidas e encontram-se disponíveis as heparinas de baixo peso molecular com eficácia antitrombótica, menos complicações hemorrágicas e redução da frequência de injeções.

Estruturalmente, as heparinas são glicosaminoglicanos sulfatados de peso molecular variável, compostos de unidades de glicosamina e ácido hexurônico, que se alternam unidas por ligações glicosídicas. O polímero apresenta micro-heterogeneidade estrutural devido à sulfatação e acetilação variáveis, bem como a distribuição das unidades de ácido hexurônico, mas a atividade biológica é semelhante.^{1,2}

A substância biológica usada na área farmacêutica pode ser extraída da mucosa intesti-

Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS – Brasil.

Correspondência para: Sérgio Luiz Dalmora
Departamento de Farmácia Industrial – Campus UFSM
97105-900 – Santa Maria-RS.
Tel/Fax: (0xx) 55 220-8805 – E-mail: sdalmora@ccs.ufsm.br

nal de bovinos e suínos, bem como de pulmões de bovinos.³ Durante o isolamento, as cadeias glicosaminoglicanas tornam-se levemente degradadas produzindo mistura heterogênea de fragmentos com massa molecular entre 3.000 e 30.000 Da. Foram encontradas diferenças de atividade específica entre as heparinas extraídas de pulmão e de mucosa intestinal analisadas pelo ensaio do anti-fator Xa.⁴ Recentemente, foram preparadas as heparinas de baixa massa molecular (HBMM) por despolimerização controlada das convencionais, obtendo-se produtos com massas moleculares entre 4.000 e 6.000 Da.^{5,6}

O mecanismo de ação das heparinas fundamenta-se na formação de complexo com a antitrombina III (AT III), com a qual tem elevada afinidade devido à seqüência pentassacáridica, que induz mudança conformacional e inativação do fator Xa e da trombina.^{7,8} A heparina também se liga à trombina, fator IXa e fator Xa.⁹⁻¹¹ A neutralização do fator Xa (atividade anti-Xa) requer a presença do pentassacárido (massa molecular~1.700 Da), enquanto a potenciação da inibição da trombina necessita cadeias de, no mínimo, 18 carboidratos (massa molecular~5.400 Da).^{12,13}

As modernas metodologias físico-químicas, tais como cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa, têm sido importantes para a análise estrutural e mecanismo de ação,² entretanto, para a avaliação de potência das heparinas convencionais são preconizados o ensaio da inibição da coagulação do plasma ovino (ICPO), o método do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e o ensaio da atividade anti-fator Xa.¹⁴⁻¹⁹ As leituras da reação final podem fundamentar-se nos graus, tempos de coagulação ou reação colorimétrica, e os ensaios são realizados contra o 5º Padrão Internacional de heparina de mucosa intestinal suína. Os procedimentos foram adotados nos diferentes estudos colaborativos internacionais, porém, há direcionamento no sentido de desenvolver e validar uma metodologia harmonizada baseada na atividade específica dos produtos farmacêuticos atuais, como o ensaio do anti-fator IIa. A geração atual de hepa-

rinhas tem massas moleculares médias mais elevadas e distribuição em faixa mais estreita, observada pela maior atividade específica, entre 180 e 210 UI/mg.²⁰⁻²³

O presente trabalho teve por objetivos realizar a avaliação comparativa de potência de heparinas convencionais pelas metodologias preconizadas para o controle da qualidade e, ao mesmo tempo, correlacionar com o ensaio padronizado do anti-fator IIa, avaliado como alternativa harmonizada, contribuindo assim para aprimorar e assegurar a eficácia clínica desses medicamentos.

Material e métodos

Reagentes e produtos farmacêuticos

5º Padrão Internacional de heparina de mucosa intestinal suína (WHO 97/578), contendo 2.031 UI/ampola. Fator Xa de plasma bovino "DIAGEN" (Diagnostic Reagents Ltda). Substratos cromogênicos S-2765 e S-2238 (Chromogenix). Fosfolipídio de cérebro de bovino (WHO 79/508). Antitrombina III humana (WHO 95/808). Trombina de plasma humano e Caolin (Sigma-Aldrich). Cloreto de cálcio e ácido acético glacial (Merck). Lotes de plasma, separados a partir da coleta de seis ovinos. Doze amostras de produtos farmacêuticos comerciais de heparina contendo, 5.000 UI/ml, provenientes de sete laboratórios e identificadas com números de 1 a 12, em seu prazo de validade.

Ensaio da inibição da coagulação do plasma ovino (ICPO)

Padronizou-se o método fundamentado na inibição da coagulação do plasma ovino.^{17,18,24} Determinou-se a concentração do padrão e da amostra que, na presença de 1 ml de plasma ovino e 0,2 ml de cloreto de cálcio 1%, permitiu o grau de coagulação 50%. Realizou-se a análise dos resultados experimentais pelo método das médias móveis.¹⁸

Ensaio do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

O método da determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) foi padronizado conforme literatura.^{19,25} Com base na

região linear da curva dose-resposta elaborada com o 5º Padrão Internacional de heparina suína, selecionaram-se três concentrações: 0,1, 0,2 e 0,4 UI/ml. Realizou-se o ensaio em tubos de polietileno colocados em coagulômetro a 37°C. Incubaram-se 100 ml de plasma ovino e 100 ml da solução de heparina padrão ou amostra por, aproximadamente, 15 minutos. Após esse período adicionaram-se a cada tubo 100 ml da mistura reagente (caolin 4g/l e fosfolípido 1/200, em volumes iguais) previamente ajustada de modo que o tempo de recalcificação obtido com o branco não excedesse sessenta segundos. Exatamente dois minutos após, adicionaram-se 100 ml da solução de CaCl₂ 25 mM e registrou-se o tempo de coagulação. Realizaram-se três ensaios independentes em duplicata.

Ensaio do anti-fator Xa

Padronizou-se o método^{14,18} e elaborou-se a curva dose-resposta, com o 5º Padrão Internacional de heparina suína. Com base na região linear selecionaram-se as concentrações de 1,0, 2,0 e 4,0 UI/ml. Em tubos de ensaio adicionaram-se 100 ml de antitrombina III e 100 ml da solução padrão e amostra, respectivamente. Homogeneizou-se. Transferiram-se 25 ml da mistura respectiva para placas de 96 poços mantida a 37°C, adicionaram-se 50 ml da solução de fator Xa bovino e registrou-se o tempo. Incubou-se por exatamente dois minutos e, então, adicionaram-se 100 ml da solução de substrato cromogênico S-2765. Interrompeu-se a reação, exatamente quatro minutos após, adicionando-se 100 ml da solução de ácido acético a 20%. Procedeu-se à leitura espectrofotométrica a 405 nm. Realizaram-se três ensaios independentes em duplicata.

Ensaio do anti-fator IIa

Padronizou-se o método^{19,26} e elaborou-se a curva dose-resposta com o 5º Padrão Internacional de heparina suína. Com base na região linear selecionaram-se as concentrações de 1,0, 2,0 e 4,0 UI/ml e executou-se o procedimento descrito no ensaio do anti-fator Xa, porém, utilizando-se 50 ml da solução de trombina e 100 ml da solução de substrato cromogênico S-2238.

Análise estatística de ensaios de retas paralelas

Os tempos de coagulação ou as absorvâncias determinadas nos ensaios para cada concentração da solução padrão e amostra foram submetidos à análise estatística de retas paralelas (3 x 3), calculando-se a variância, potência estimada, limites de confiança (P=0,95) e precisão, expressa pela ponderação, usando-se programa de computação SAS para Windows versão 6.11.

Resultados

Avaliação de potência pelo ensaio da inibição da coagulação do plasma ovino (ICPO)

Os graus de coagulação determinados nos ensaios das preparações farmacêuticas de heparina foram submetidos à análise estatística em relação ao 5º Padrão Internacional de heparina suína, fornecendo os resultados de potência e limites de confiança (Tabela 1).

Foram também realizados ensaios de três lotes de heparina utilizando-se cinco diferentes

Tabela 1
Potência e limites de confiança (P=0,95) calculados para as preparações de heparina avaliadas pelo ensaio da inibição da coagulação do plasma ovino, em relação ao 5º Padrão Internacional de heparina suína, pela combinação de três ensaios independentes

Amostra	Potência			Limites de confiança
	Declarada	Encontrada	%	
	UI/ml	UI/ml	%	%
1	5.000	5.005	100,10	96,47 - 103,85
2	5.000	4.925	98,50	95,50 - 101,60
3	5.000	5.216	104,32	100,22 - 108,57
4	5.000	4.884	97,68	90,09 - 105,92
5	5.000	4.870,5	97,41	94,50 - 100,41
6	5.000	4.970,5	99,41	96,40 - 102,40
7	5.000	5.058,5	101,17	88,95 - 115,06
8	5.000	4.536,5	90,73	83,38 - 98,71
9	5.000	6.113,5	122,27	111,73 - 133,81
10	5.000	6.104	122,08	112,62 - 132,32
11	5.000	5.339	106,78	100,80 - 113,12
12	5.000	5.747	114,94	106,18 - 124,40

Tabela 2
Avaliação de potência de heparinas em produtos farmacêuticos, com lotes diferentes de plasma, pelo ensaio da inibição da coagulação do plasma ovino

Amostra	Plasma Lote	Tempo de Coagulação	Potência			
			Declarada	Encontrada		Limites de confiança
			UI/ml	UI/ml	%	%
A	1	3'15"	5.000	5.255	105,10	101,60 - 108,80
	2	3'45"	5.000	5.025	100,50	93,60 - 107,80
	3	3'00"	5.000	5.262	105,24	100,05 - 110,72
	4	2'30"	5.000	5.133	102,66	98,35 - 107,17
	5	2'07"	5.000	4.974,5	99,49	94,70 - 104,55
B	1	3'20"	5.000	4.892	97,84	93,10 - 102,80
	2	3'40"	5.000	4.805	96,10	91,10 - 101,40
	3	3'10"	5.000	5.163	103,26	92,09 - 110,78
	4	2'20"	5.000	5.086	101,72	93,37 - 103,45
	5	2'10"	5.000	4.934,5	98,69	93,41 - 104,26
C	1	3'05"	5.000	5.390	107,80	92,50 - 113,40
	2	3'58"	5.000	5.247	104,94	96,18 - 114,40
	3	3'30"	5.000	5.535	110,70	101,79 - 120,31
	4	2'35"	5.000	5.216,5	104,33	98,02 - 111,00
	5	2'30"	5.000	5.169	103,38	96,03 - 111,25

Tabela 3
Potência, limites de confiança (P=0,95), precisão das estimativas dos dois ensaios combinados das preparações de heparina, em relação ao 5º Padrão Internacional, pelo ensaio do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

Amostra	Potência				Ponderação
	Declarada	Encontrada		Limites de confiança	
	UI/ml	UI/ml	%	%	
1	5.000	4.083	81,66	78,09 - 85,40	12.560
2	5.000	4.072	81,44	77,87 - 85,12	16.063
3	5.000	4.508,5	90,17	86,49 - 94,00	14.534
4	5.000	4.500,5	90,01	87,33 - 92,76	27.572
5	5.000	4.279,5	85,59	79,25 - 88,17	8.869
6	5.000	4.976	99,52	91,18 - 108,61	4.233
7	5.000	4.398,5	87,97	84,58 - 91,50	16.286
8	5.000	4.414,5	88,29	84,29 - 92,43	14.979
9	5.000	5.565	111,30	105,38 - 117,64	10.509
10	5.000	5.732	114,64	109,32 - 120,23	11.129
11	5.000	4.599	91,98	87,77 - 96,41	11.430
12	5.000	4.665,5	93,31	89,94 - 96,80	18.623

lotes de substrato de plasma ovino. A Tabela 2 mostra os valores cujas médias calculadas são $102,60 \pm 2,55$, $99,52 \pm 2,93$ e $106,23 \pm 2,82$, respectivamente, com variação de até 7,32% das potências estimadas de cada amostra.

Estudou-se também a estabilidade da solução diluída de heparina com 50 UI/ml, conservada em geladeira, observando-se, após análises sucessivas pelo ensaio do ICPO, diminuição da atividade de 4% no 14º dia, em relação ao teor inicial.

Avaliação de potência pelo ensaio do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

Os tempos de coagulação obtidos nas avaliações das preparações farmacêuticas em relação ao 5º Padrão Internacional de heparina suína, foram submetidos ao cálculo estatístico que apresentaram os valores de potência, limites de confiança (P=0,95) e precisão (Tabela 3).

Avaliação de potência pelo ensaio do anti-fator Xa

Os valores de absorvância obtidos na análise dos produtos farmacêuticos em relação ao 5º Padrão Internacional de heparina suína, pelo ensaio do anti-fator Xa, foram submetidos ao cálculo estatístico fornecendo os resultados de potência, limites de confiança (P=0,95) e precisão das estimativas (Tabela 4).

Avaliação de potência pelo ensaio do anti-fator IIa

Os valores de absorvância obtidos na avaliação dos produtos farmacêuticos em relação ao 5º Padrão Internacional de heparina suína, pelo ensaio do anti-fator IIa cromogênico, usando antitrombina III, foram submetidos ao cálculo estatístico fornecendo os resultados de potência, limites

Tabela 4
Potência média, limites de confiança (P=0,95), precisão das estimativas dos dois ensaios combinados das preparações de heparina, em relação ao 5º Padrão Internacional, pelo ensaio do anti-fator Xa

Amostra	Potência				Ponderação
	Declarada	Encontrada		Limites de confiança	
	UI/ml	UI/ml	%	%	
1	5.000	4.455	89,10	83,61 - 94,90	5.452
2	5.000	4.055	81,10	76,60 - 85,86	6.911
3	5.000	4.513,5	90,27	83,45 - 97,65	4.084
4	5.000	4.468	89,36	83,45 - 95,62	5.486
5	5.000	4.210	84,20	74,67 - 94,95	1.746
6	5.000	4.994,5	99,89	83,40 - 119,63	1.003
7	5.000	4.464	89,28	81,45 - 97,86	2.990
8	5.000	4.020,5	80,41	73,91 - 87,48	3.552
9	5.000	5.607,5	112,15	101,75 - 123,62	2.658
10	5.000	5.458,5	109,17	102,72 - 116,41	6.437
11	5.000	5.430	108,60	96,76 - 112,10	2.378
12	5.000	4.872	97,44	88,89 - 106,80	2.990

Tabela 5
Potência média, limites de confiança (P=0,95), precisão das estimativas de dois ensaios combinados de preparações de heparinas convencionais, em relação ao 5º Padrão Internacional, pelo ensaio do anti-fator IIa

Amostra	Potência				Ponderação
	Declarada	Encontrada		Limites de confiança	
	UI/ml	UI/ml	%	%	
1	5.000	4.372	87,44	78,23 - 97,48	2.655
2	5.000	4.305	86,10	74,26 - 95,21	2.061
3	5.000	4.528,5	90,57	84,37 - 116,42	1.228
4	5.000	4.328	86,56	77,98 - 96,08	2.312
5	5.000	4.211,5	84,23	78,95 - 96,19	3.265
6	5.000	4.766	95,32	90,25 - 100,70	1.320
7	5.000	4.407,5	88,15	79,61 - 97,42	3.146
8	5.000	4.238	84,76	76,67 - 93,71	2.503
9	5.000	5.829,5	116,59	107,06 - 126,98	3.460
10	5.000	5.717	114,34	102,28 - 127,82	2.028
11	5.000	5.033,5	100,67	92,79 - 109,01	3.883
12	5.000	4.932	98,64	82,27 - 114,18	1.184

de confiança (P=0,95) e precisão das estimativas (Tabela 5).

Os resultados obtidos nas avaliações de potência dos doze lotes de produtos farmacêuticos de heparinas pelas quatro diferentes metodologias, forneceram as médias de 104,62% ± 9,64 para o ICPO, 92,99% ± 11,36 para TTPA, 94,25% ± 11,74 para anti-fator Xa e 94,45% ± 11,85 para anti-fator IIa. A diferença foi significativa (p<0,05) somente para o ICPO em relação aos outros métodos.

Discussão

O método da inibição da coagulação do plasma ovino tem sido amplamente adotado e continua preconizado para a avaliação de potência de heparinas não-fracionadas em produtos farmacêuticos.^{17,18} Recentemente foram desenvolvidas as heparinas fracionadas, de baixo peso molecular,²⁷ para as quais o procedimento não é reprodutível (dado não mostrado). Realizou-se a dosagem de potência de heparinas convencionais contra o 5º Padrão Internacional de heparina suína obtendo-se resultados reprodutíveis, com média de intervalos de confiança de 0,024 ± 0,02, inferior ao limite de 0,20 estabelecido para realização de ensaios adicionais.¹⁸ Pode-se também observar (Tabela 1) que algumas amostras de produtos comerciais não cumpriram as especificações de potência para utilização clínica, que preconizam limites entre 90% e 110% em relação à declarada.^{17,18} Há registros de que a expressão de unidades USP é 7,6% a 10,6% superior em relação às internacionais, razão pela qual optou-se por manter sempre como referência o Padrão Internacional.^{22,28}

Os resultados obtidos com amostras de produtos farmacêuticos submetidos ao ensaio do ICPO utilizando

diferentes lotes de plasma ovino, sempre separado a partir de sangue coletado de seis animais, demonstram variação de potência de até 7,32% (Tabela 2), coerente com dados da literatura,²² demonstrando a influência do plasma e a importância da qualidade, determinada pelo menor tempo de coagulação, para assegurar a reprodutibilidade das potências estimadas lote a lote.

O método do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) foi padronizado com plasma ovino fornecendo resultados comparáveis aos obtidos com plasma humano (dado não mostrado).^{19,20,25} Para cada ensaio, efetuou-se a análise de variância demonstrando ser a regressão significativa ($p < 0,05$), e os desvios de linearidade e paralelismo, não significativos. Observa-se também que cada amostra forneceu resultados específicos, alguns dos quais fora dos limites estabelecidos, e, em geral, inferior ao ICPO. Há variedade de fosfolípidios comerciais que diferem consideravelmente em sua sensibilidade, demonstrando que curvas dose-resposta mais acentuadas tornam os ensaios mais precisos.²⁹ Nesse trabalho, usou-se fosfolípido extraído de cérebro bovino disponível como reagente internacional que propiciou inclinação significativa e precisão média dos ensaios independentes ($n=24$) de 6.949.

Selecionou-se também a metodologia baseada na inibição do fator Xa, protease intermediária da cascata de coagulação, com determinação do ponto final com substrato peptídico amidolítico e quantificação espectrofotométrica.^{18,20,25,30} Realizou-se a avaliação de produtos farmacêuticos comerciais obtendo-se potências entre 80,41% e 112,15%, (Tabela 4). Os produtos cumprem os requisitos farmacopéicos que preconizam atividade entre 80-125%. A média das ponderações dos ensaios independentes ($n=24$) foi de 1.903.

A avaliação comparativa das atividades biológicas encontradas no estudo das doze amostras de heparinas convencionais demonstrou que o ensaio do plasma ovino (ICPO) apresentou potências médias 11,63% superiores ao TTPA, ($p < 0,05$). Por sua vez, o método do anti-fator Xa forneceu potências semelhantes ao TTPA, diferença de 1,26%.

A literatura^{20,31} registra diferenças inferiores a 3,5% em estudos colaborativos pelos métodos do TTPA e anti-fator Xa, podendo-se deduzir que os dados aqui apresentados foram reprodutíveis.

O ensaio do anti-fator IIa, adotado para as heparinas fracionadas,¹⁸ está sendo sugerido como método harmonizado para a avaliação de potência de heparinas não-fracionadas, pois em contraste ao fator Xa, a trombina catalisa rapidamente reações fundamentais na cascata: clivagem do fibrinogênio, ativação dos fatores V e VIII e ativação do receptor expressando a atividade anticoagulante.^{22,30} Foi então padronizado com plasma ovino (dado não mostrado) e antitrombina III, cujos resultados encontram-se na Tabela 5. Os valores de potência obtidos com as mesmas 12 amostras foram em geral semelhantes, com média de 94,25% para o anti-fator Xa e 94,45% para o anti-fator IIa. Comparando-se as tabelas 4 e 5, observa-se, aproximadamente, a relação 1:1 entre as atividades anti-fator Xa e IIa. Sugere-se sua inclusão em estudos sucessivos para demonstrar sua robustez e validade para que possa ser preconizado para o controle da qualidade de medicamentos.²²

É importante destacar que os resultados dos ensaios estão relacionados diretamente às características específicas das matérias-primas usadas no produto acabado, razão pela qual as amostras apresentam diferenças variáveis em relação às médias comparativas dos ensaios. Conclui-se observando a importância da padronização dos procedimentos, do desenvolvimento de novos métodos e da harmonização para assegurar a qualidade e eficácia clínica das heparinas não-fracionadas.

Abstract

The biological evaluation of unfractionated heparins was carried out against the 5th International Standard of porcine heparin using the pharmacopoeial-recommended assays: the sheep plasma coagulation inhibition assay (SPCIA), activated partial thromboplastin time (APTT) and anti-factor Xa activity. The SPCIA method gave mean potencies which were 10.72% significantly higher than the other procedures. The effect of differences in plasma batches

revealed potency variations of up to 7.32%. The anti-factor IIa assay was standardized as an alternative method for the potency assessment of heparin samples. The values obtained were in good agreement with the anti-factor Xa assay results, demonstrating the feasibility of the method as a harmonized assay for the quality control of medicines. Analysis of the potency estimates showed that generally batch-to-batch variations complied with pharmacopoeial specifications, demonstrating the overall quality of the products and assuring their safety and clinical efficacy. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2003;25(2):103-110.

Key words: Heparins; sheep plasma; anti-factor Xa; activated partial thromboplastin time; anticoagulant; anti-factor IIa.

Referências Bibliográficas

- Björk I, Lindahl U. Mechanism of the anticoagulant action of heparin. *Mol Cell Biochem* 1982;48:161-82.
- Nugent MA. Heparin sequencing brings structure to the function of complex oligosaccharides. *PNAS* 2000;97:10.301-03.
- Barrowcliffe TW, Thomas DP. Heparin and low molecular weight heparin. *Thromb Haemost* 1994; 2:1.417-438.
- Barrowcliffe TW, Johnson EA, Eggleton CA. Anticoagulant activities of lung and mucous heparins. *Thromb Res* 1977;12:27-36.
- Johnson EA, Kirkwood TBL, Stirling Y, Perez-Requejo JL, Ingram GIC, Bangham DR, Brozovic M. Four heparin preparations: anti-Xa potentiating effect of heparin after subcutaneous injection. *Thromb Haemost* 1976;35: 586-91.
- Barrowcliffe TW. Annotation: low molecular weight heparin(s). *Br J Haematol* 1995;90:1-7.
- Hemker HC, Béguin S. The mode of action of heparins in vitro and in vivo. *Adv Exp Med Biol* 1992;313:221-30.
- Quinsey NS, Whisstock JC, Le Bonniec BF, Louvain VB, Bottomley SP, Pike RN. Molecular Determinants of the Mechanism Underlying Acceleration of the Interaction between Antithrombin and Factor Xa by Heparin Pentasaccharide. *J Biol Chem* 2002; 277:15.971-78.
- Thunberg L, Backstrom G, Lindahl U. Further characterization of the antithrombin-binding sequence in heparin. *Carbohydr Res* 1982; 100:394-10.
- Lindahl U, Backstrom G, Thunberg L. The antithrombin-binding sequence in heparin. *J Biol Chem* 1983; 258: 9.826-30.
- Hirsh J, Dalen JE, Deykin D, Pooler L. Heparin: mechanism of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 1992;102:337S-51S.
- Lane DA, Denton J, Flynn AM, Thunberg L, Lindahl U. Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. *Biochem J* 1984; 218:725-32.
- Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, Fuster V. Mechanism of Action and Pharmacology of Unfractionated Heparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1.094 -96.
- Denson KWE, Bonnar J. The measurement of heparin: a method based on the potentiation of anti - factor Xa. *Thrombos Diathes Haemorrh* 1973;30:471-9.
- Yin ET, Wessler S, Butler JV. Plasma heparin: a unique, practical submicrogram sensitive assay. *J Lab Clin Med* 1973;81:298-10.
- Barrowcliffe TW, Mulloy B, Johnson EA, Thomas DP. The anticoagulant activity of heparin: measurement and relationship to chemical structure. *J Pharm Biomed Anal* 1989;7:217-26.
- Farmacopéia Brasileira. 4 edição. São Paulo: Atheneu, 1988.
- The United States Pharmacopeia. 25th edition. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2001.
- European Pharmacopoeia. 4th edition. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2002.
- Thomas DP, Curtis AD, Barrowcliffe TW. A collaborative study designed to establish the 4th International Standard for heparin. *Thromb Haemost* 1984;52: 148-53.
- Gray E, Heath AB, Mulloy B, Spieser JM, Barrowcliffe TW. A collaborative study of proposed european pharmacopoeia reference preparations of low molecular mass heparins. *Thromb Haemost* 1995;74:893-9.
- WHO working group on biological standardization of unfractionated heparin. Geneva: World Health Organization, 1999.
- Rezaie AR. Prothrombin protects factor Xa in the prothrombinase complex from inhibition by the heparin-antithrombin complex. *Blood* 2001;97: 2.308-13.
- Dalmora SL, Assaf GSC, Dalmora MEA, Vaucher LC, Vaccari SF. Determinação da atividade anticoagulante da heparina. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 1991;46: 59-62.
- Barrowcliffe TW. Heparin assays and standardization. In: Lane DA, Lindahl U. (Ed). Heparin. London: Edward Arnold, 1988. 393-415.
- Padilla A, Gray E, Pepper DS, Barrowcliffe TW. Inhibition of thrombin generation by heparin and low molecular weight (LMW) heparins in the absence and presence of platelet factor 4 (PF4). *Br J Haematol* 1992;82: 406-13.
- Boneu B. Low Molecular Weight Heparins: Are they superior to unfractionated heparins to prevent and to treat deep vein thrombosis? *Thromb Haemost* 2000; 100:113-20.

28. Albertengo ME, Chiale CA, Guagliardo MV, Oliva LM. Heparina sódica y heparina cálcica: Unidades en las que se debe expresar su potencia en Argentina. *Sangre* 1998;43:257-9.
29. Barrowcliffe TW, Gray E. Studies of phospholipid reagents used in coagulation. II: Factors influencing their sensitivity to heparin. *Thromb Haemost* 1981;46:634-9.
30. Bianchini EP, Louvain VB, Marque PE, Juliano MA, Juliano L, Le Bonniec BF. Mapping of the Catalytic Groove Preferences of Factor Xa Reveals an Inadequate Selectivity for Its Macromolecule Substrates. *J Biol Chem* 2002;277:20.527-34.
31. Albertengo ME, Cinto RO, Araldi HT, Vernengo MJ. Materiales regionales latinoamericanos de referencia de heparina porcina y heparina bovina. *Sangre* 1990;35:69-72.

Recebido: 27/12/02

Aceito: 20/03/03