

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIÊ ASSIS MELO FARIA

ARABINOGALACTANA DA FARINHA DE SOJA: SULFATAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTICOAGULANTE E APLICAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

CURITIBA

2018

FRANCIÊ ASSIS MELO FARIA

ARABINOGALACTANA DA FARINHA DE SOJA: SULFATAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTICOAGULANTE E APLICAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

Co-orientadora: MSc Helyn Priscila de Oliveira Barddal

CURITIBA

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

FRANCIÊ ASSIS MELO FARIA

ARABINOGALACTANA DA FARINHA DE SOJA: SULFATAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E APLICAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do grau de Graduada em Biomedicina. Este trabalho foi avaliado pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

Orientador – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti

Professor convidado – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

Dr. Yony Román Ochoa

Doutor convidado – Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 12 de dezembro de 2018

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer aos meus pais, Rosely Assis Melo Faria e Márcio Diógenes de Faria, por todo amor que me ofereceram e oferecem.

Além disso, sou muito grata ao professor orientador Thales Ricardo Cipriani pelo acompanhamento, ajuda e apoio. Como também, à mestre Helyn Priscila de Oliveira Barddal por me ensinar e contribuir em toda minha orientação.

Os estudantes do laboratório de Bioquímica sempre foram muito acolhedores e queridos comigo, em especial à Giuliana Conzella, Pedro Chaves e Yony Román, por toda a disposição em me ajudar.

À equipe do Hospital Veterinário pela realização das análises bioquímicas e hematológicas, em especial ao Olair Carlos Beltrame.

Aos meus professores que me ensinaram o que sei até hoje e me possibilitaram estudar e aprender cada vez mais.

Ao meu namorado Guilherme Haoach Saccomori que esteve ao meu lado em todas as minhas dificuldades ao longo da faculdade.

Ao mestre Carlos Bernardo González Pecotche, que me ofereceu com todo afeto seus ensinamentos que me guiam na busca da minha evolução como ser humano.

“É preciso, então, concretizar na vida tudo quanto se aspirou para ela, sem esmorecer diante das dificuldades, porque estas provam frequentemente nossa resistência e a firmeza de nossa vontade.”

RESUMO

Os anticoagulantes são estruturas capazes de inibir o processo de coagulação, fazendo com que o sangue permaneça fluido. Essa característica é essencial em diversas situações, como por exemplo, na coleta sanguínea para realização de exames rotineiros. Existem algumas opções de anticoagulantes, os quais se apresentam mais adequados para determinados exames. A heparina é um dos anticoagulantes comumente usados. Esta apresenta uma estrutura altamente sulfatada, constituída por dissacarídeos contendo unidades de α -D-glucosamina e ácido urônico unidas por ligações 1 \rightarrow 4 e apresenta massa molar entre 3.000 a 30.000 g/mol. Em cada unidade dissacarídica, a quantia média de sulfato é de aproximadamente 2,5 resíduos. A heparina é capaz de interagir, principalmente por meio dos grupos sulfato, com proteínas inibidoras da cascata de coagulação como a AT (antitrombina), potencializando a ação desta serpina sobre a T (trombina) e o FXa (fator Xa). Apesar de ser uma das opções de uso como anticoagulante em coletas sanguíneas em laboratórios clínicos, a heparina, assim como os demais anticoagulantes, confere interferências em determinados exames, comprometendo a qualidade dos resultados. Diante disso, o objetivo deste trabalho é a obtenção de um agente anticoagulante alternativo, a partir da sulfatação química do polissacarídeo da farinha de soja. O polissacarídeo presente na farinha de soja é uma arabinogalactana do tipo I (AG), apresentando um peso molecular médio de 124.000 g/mol. É composta por uma cadeia principal de unidades de β -(1 \rightarrow 4) D-galactopiranosose (Galp) com algumas ramificações em O-3 contendo unidades de α -(1 \rightarrow 5) L-arabinofuranose (Araf). A farinha de soja (500 g) passou por processo de extração aquosa e purificação. Após precipitação com etanol, congelamento e degelo, diálise em membrana de 100.000 g/mol e precipitação de proteínas com TCA 10% (v/v), chegou-se à fração AG (503 mg). Uma parte da fração AG (400 mg) passou pelo processo de sulfatação química, dando origem à fração AGS (427mg), apresentando um DS de 0,39. Os perfis de eluição em HPSEC da fração AG e AGS não se apresentaram homogêneos, tendo presente dois picos principais. Os espectros de HSQC-DEPT das frações AG e AGS corresponderam com sinais de α -L-Araf e β -D-Galp, além de sinais de α -L-Rhap e de α -D-GalAp. A composição monossacarídica de ambas as frações apresentaram maiores proporções de galactose, arabinose e ramnose, respectivamente, apresentando também 21,3 % de ácido urônico em AG e 14,8% em AGS. A fração AGS (50 μ g/mL) conseguiu aumentar o tempo de aPTT em 6,89 vezes quando comparado ao controle negativo. Para avaliação da possibilidade do uso de AGS como anticoagulante em tubos de coleta, foram utilizados 40 μ L de AGS (35 mg/mL) por tubo. Os resultados bioquímicos dos tubos contendo AGS se assemelharam, na maior parte dos parâmetros com o dos tubos contendo EDTA. Já os resultados hematológicos, apresentaram diferença significativa na maior parte dos parâmetros quando comparados com os tubos contendo EDTA. Além disso, os tubos contendo AGS apresentaram hemólise. Diante disso, AGS não se apresentou um anticoagulante versátil e adequado para análises bioquímicas e hematológicas.

Palavras-chave: Anticoagulante. Polissacarídeo. Sulfatação química. Tubos de coleta de sangue. Farinha de soja.

ABSTRACT

Anticoagulants are structures capable of inhibiting the coagulation process, in order to keep the blood fluid. This characteristic is essential in several situations, such as in blood collection for routine exams. There are some options for anticoagulants, which are more suitable for certain tests. Heparin is one of the most used as anticoagulants. It has a highly sulfated structure, consisting of disaccharides composed by D-glucosamine and an uronic acid residue, connected by 1→4 linkages and has molar mass between 3.000 and 30.000 g/mol. Each disaccharide unit, the average of sulfate is approximately 2,5 residues. Heparin is capable of interacting, mainly through sulfate groups, with coagulation cascade inhibiting proteins such as AT (antithrombin), potentiating the action of this serpin on T (thrombin) and FXa (factor Xa). Although it is one of the options for anticoagulant use in blood collections in clinical laboratories, heparin, as well as other anticoagulants, interferes in certain tests, compromising the quality of the results. Therefore, the objective of this work is to obtain an alternative anticoagulant agent, based on the chemical sulfation of the soybean meal polysaccharide. The polysaccharide present in soybean meal is an arabinogalactan type I (AG), having an average molecular weight of 124.000 g/mol. It is composed of a major chain of β -(1→4) D-galactopyranose (Gal ρ) units which some are substituted at O-3 by side chains containing α -(1→5) L-arabinofuranose (Araf) residues. The soybean meal (500 g) passed by hot-water-extraction and purification. After ethanol precipitation, freeze-thawing, 100.000 g/mol dialysis membrane and protein precipitation with TCA 10% (v / v) came to the AG fraction (503 mg). A portion of the AG (400 mg) passed by chemical sulfation, giving rise to the AGS fraction (427 mg), presenting a DS of 0,39. The HPSEC elution profiles of the AG and AGS fraction were not homogeneous, with the presence of two main peaks. HSQC-DEPT spectra of AG and AGS fractions corresponded to α -L-Araf and β -D-Gal ρ signals, as well as α -L-Rhap and α -D-GalA ρ signals. The monosaccharide composition of both fractions presented higher proportions of galactose, arabinose and rhamnose, respectively, also presenting 21,3% of uronic acid in AG and 14,8% in AGS. The AGS fraction (50 μ g/mL) was able to increase the aPTT time by 6,89 times when compared to the negative control. To evaluate the possibility of the use of AGS as anticoagulant in collection tubes, 40 μ L of AGS (35 mg/mL) per tube was used. The biochemical results of the tubes containing AGS most closely resemble those of tubes containing EDTA. In the other hand, hematological results showed a significant difference in most of the parameters when compared to tubes containing EDTA. In addition, the tubes containing AGS showed hemolysis. Therefore, AGS did not present a versatile anticoagulant suitable for biochemical and hematological analysis.

Keywords: Anticoagulant. Polysaccharide. Chemical sulfation. Blood collection tubes. Soybean meal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	-	ESQUEMA DA CASCATA DE COAGULAÇÃO.....	17
FIGURA 2	-	ESTRUTURA DA HEPARINA EM SUA REGIÃO REGULAR (N-sulfatada).....	26
FIGURA 3	-	SEQUENCIA PENTASSACARÍDICA DA HEPARINA DE LIGAÇÃO À AT UNIDO ÀS 18 UNIDADES DE AÇUCARES.....	27
FIGURA 4	-	ESTRUTURA DA ARABINOGALACTANA DO TIPO I PROVENIENTE DA FARINHA DE SOJA.....	29
FIGURA 5	-	ESQUEMA DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ARABINOGALACTANA PROVENIENTE DA FARINHA DE SOJA.	33
FIGURA 6	-	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) DAS FRAÇÕES AG E AGS.....	40
FIGURA 7	-	PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES AG e AGS.....	41
FIGURA 8	-	ESPECTRO DE HSQC-DEPT 135 DA FRAÇÃO AG (a) e AGS (b) EM D ₂ O À 50°C.....	43
FIGURA 9	-	ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DA FRAÇÃO AGS E HEPARINA....	44
FIGURA 10	-	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS BIOQUÍMICOS DAS AMOSTRAS DE SANGUE COLETADAS COM EDTA E COM AGS....	45
FIGURA 11	-	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS HEMATOLÓGICOS DAS AMOSTRAS DE SANGUE COLETADOS COM EDTA E COM AGS....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	RECUPERAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS AG E AGS.....	39
TABELA 2-	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO AG E AGS.....	41
TABELA 3 -	DOSAGEM DE SULFATO DA AMOSTRA AGS.....	42
TABELA 4 -	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE EXAMES BIOQUÍMICOS DE RATOS WISTAR OBTIDOS NESTA PESQUISA, UTILIZANDO EDTA E AGS COMO ANTICOAGULANTES, COM AQUELES OBTIDOS EM OUTROS ESTUDOS.....	47
TABELA 5 -	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE EXAMES HEMATOLÓGICOS DE RATOS WISTAR OBTIDOS NESTA PESQUISA, UTILIZANDO EDTA E AGS COMO ANTICOAGULANTES, COM AQUELES OBTIDOS EM OUTROS ESTUDOS.....	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Hemostasia	14
2.2 Modelo clássico da coagulação	16
2.3 Modelo da coagulação baseado na célula	17
2.4 Sistema fibrinolítico	19
2.5 Regulação da hemostasia	20
2.6 Distúrbios na coagulação	21
2.7 Testes laboratoriais da hemostasia	22
2.8 Anticoagulantes usados <i>in vivo</i>	23
2.9 Anticoagulantes usados para coleta sanguínea	24
2.10 Heparina	25
2.10 Polissacarídeos sulfatados	28
2.11 Farinha de soja	28
3 OBJETIVO E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3.1 Objetivo	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Material	32
4.2 Extração e purificação	32
4.3 Sulfatação química	33
4.4 Análise Estrutural	33
4.4.1 Dosagem de Ácidos Urônico	33
4.4.2 Análise de Proteínas	34
4.4.3 Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Eficiência (HPSEC) e Determinação da Massa Molar (M_w)	34
4.4.4 Composição Monossacarídica	34
4.4.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	35
4.4.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	36
4.4.7 Dosagem de Sulfato	36
4.5 Atividade anticoagulante <i>in vitro</i>	37
4.5.1 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT)	37
4.6 Avaliação da possibilidade de utilização de AGS como anticoagulante em coleta de sangue para análises clínicas	37

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Obtenção e análise estrutural do polissacarídeo quimicamente sulfatado (AGS).	39
5.2 Avaliação da possibilidade de utilização de AGS como anticoagulante em coleta de sangue para análises clínicas	43
6 CONCLUSÕES	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

Quando um vaso sanguíneo é lesionado, inicia-se o processo de coagulação com a finalidade de tentar conter o extravasamento do sangue. Para que isso ocorra, são necessárias várias reações de um processo denominado cascata de coagulação (CARLOS e FREITAS, 2007). Os constituintes desse processo devem ser regulados para evitar a perda excessiva de sangue e evitar a formação disseminada de trombos intravasculares decorrentes da formação excessiva de fibrina (FRANCO, 2001). Os anticoagulantes são estruturas capazes de inibir o processo de coagulação, fazendo com que o sangue permaneça fluido. Essa característica é essencial em diversas situações, como por exemplo, na coleta sanguínea para realização de exames rotineiros.

Existem variadas opções de anticoagulantes, os quais se apresentam mais adequados para determinados exames. Os anticoagulantes comumente usados são o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), a heparina e o citrato de sódio. Os sais de ácido etilenodiamino tetra-acético potássico (EDTA-K₃) ou sódico (EDTA-Na₂) são utilizados na hematologia humana e na de outros mamíferos. A heparina é utilizada para bioquímica clínica e gasometria e o citrato de sódio é necessário para estudos referentes aos tempos de coagulação e testes de agregação plaquetária (ALVES, 2013). Está bem estabelecido que cada um desses anticoagulantes tradicionais possui seu próprio mecanismo de ação, tendo comumente, variadas interações. Essas interações com múltiplos alvos diminuem a especificidade dos anticoagulantes tradicionais e criam limitações para seu uso (CEDRONE *et al.*, 2018). Diante disso, muitas vezes é necessária a coleta sanguínea em diferentes tubos contendo anticoagulantes distintos para abarcar a gama de exames solicitados de modo a garantir integridade e assertividade dos resultados.

A heparina, um dos anticoagulantes mais utilizados, pertence à família dos glicosaminoglicanos (GAG) e é constituída por dissacarídeos contendo unidades de α -D-glucosamina (GlcN_p) e ácido urônico: α -L-idurônico (IdoA_p) ou β -D-glucurônico (GlcA_p) (ALBAN *et al.*, 2002). A heparina é um polissacarídeo naturalmente sulfatado, e sua distribuição dos resíduos de sulfato ao longo da cadeia polissacarídica é importante para a interação da molécula com os inibidores de proteases e com enzimas do sistema de coagulação (POMIN, 2009). Essa atividade, elucidada no início de 1980, é exercida por meio da interação da heparina com o inibidor AT

(antitrombina) e o cofator II de heparina (HCII), que desencadeia a inativação da trombina e outras proteases da cascata de coagulação (BARROWCLIFFE *et al.*, 1989).

Apesar de a heparina conferir grande contribuição médica, ela apresenta desvantagens que restringem sua utilização, como seu alto custo, efeitos adversos *in vivo* (risco de hemorragia e trombocitopenia), além de efeitos não desejados *in vitro* como interferências em alguns ensaios clínicos (ALBAN *et al.*, 2002). Diante disso, o emprego de uma molécula com atividade anticoagulante similar ao da heparina, com menores interferências nos exames clínicos e menos onerosa, é uma boa alternativa para o mercado.

Estudos descrevem que polissacarídeos sulfatados são de grande interesse devido às suas múltiplas atividades farmacológicas, dentre elas, anticoagulante e antitrombótica (ALBAN *et al.*, 2002). Os trabalhos com polissacarídeos quimicamente sulfatados geralmente focam na obtenção de moléculas que poderiam substituir a heparina para uso *in vivo*. Contudo, os polissacarídeos quimicamente sulfatados apresentam potencial anticoagulante para uso em tubos de coleta sanguínea. Portanto, este trabalho tem por objetivo a obtenção de um agente anticoagulante para uso em coleta sanguínea, estudando o seu efeito nos resultados bioquímicos e hematológicos.

Nesse caso, utilizamos a farinha de soja com intuito de que, a partir de sua extração, o polissacarídeo presente (arabinogalactana do tipo I) sofra mudanças estruturais por meio da sulfatação, conferindo características farmacológicas semelhantes ao da heparina. A arabinogalactana do tipo I da farinha de soja apresenta uma cadeia principal de unidades de β -D-galactopiranosose (Galp) (1 \rightarrow 4)-ligadas, com algumas ramificações em O-3 contendo unidades de α -L-arabinofuranose (Araf) (1 \rightarrow 5)-ligadas. A soja apresenta uma grande importância econômica no mundo com um patamar de crescimento constante, inclusive no Brasil (RIGO, 2015). Além disso, já foi protagonista em estudos biomédicos promovendo ação coadjuvante antitumoral, anti-inflamatória, antioxidativa e gastroprotetora (JIA *et al.*, 2015; CIPRIANI *et al.*, 2009). Portanto, a soja é uma alternativa interessante para estudos de sulfatação química e avaliação de atividade anticoagulante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hemostasia

O processo de hemostasia é definido pelo equilíbrio entre a pró-coagulação e a anticoagulação, tendo por objetivo, manter o sangue intravascular em um estado fluido e dentro do vaso. Portanto, contém o extravasamento do sangue por meio da formação de coágulos e permite a manutenção da sua fluidez ao removê-los. Os principais componentes deste processo são: o endotélio, os componentes da matriz subendotelial como o colágeno, e componentes sanguíneos (plaquetas, fatores de coagulação, proteínas adesivas, sistema fibrinolítico e inibidores da coagulação) (CURNOW *et al.*, 2016). Quando um vaso sanguíneo é lesado, há três mecanismos ativados que são muito importantes para o controle da perda de sangue: a vasoconstrição para que haja uma diminuição do fluxo sanguíneo, a adesão plaquetária, que resulta na formação de um tampão plaquetário constituindo a primeira barreira para saída do sangue dos vasos e, finalmente, a formação de fibrina, aprisionando a massa de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Esse conjunto de elementos resulta no coágulo, que se adere nas paredes dos vasos e interrompem o extravasamento de sangue. Esses mecanismos ocorrem apenas no local da lesão e são controlados com o objetivo de que se mantenham inativos quando distantes da região danificada (RUTTMANN, 2006; CARLOS e FREITAS, 2007). Este equilíbrio concebido pela variedade de mecanismos hemostáticos ocorre, resumidamente, por meio de interações entre proteínas, respostas celulares complexas e regulação do fluxo sanguíneo (FRANCO, 2001).

A vasoconstrição é uma ação imediata após o dano e acontece por uma combinação de fatores: espasmo do músculo liso intramural, atividade reflexa dos nervos vasomotores do sistema nervoso simpático e liberação de substâncias vasoconstritoras (com ação de 20 a 60 minutos) (CARLOS e FREITAS, 2007). O rompimento das células endoteliais que recobrem a parede vascular, fisiologicamente ou em consequência de uma lesão no tecido, causa a exposição da matriz subendotelial (colágeno e Fator de Von Willebrand ou FVW). Essa interação inicial, por meio das proteínas adesivas que foram expostas, causa mudança conformacional das plaquetas, as quais se tornam mais esférica com emissão de inúmeros pseudópodes, processo este que é denominado de *shapechange*. A região da lesão

funciona como um sítio de ligação para as plaquetas, ativando os receptores glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), tendo como resposta a esse estímulo a liberação de adenosina-difosfato (ADP) (agregante plaquetário), tromboxano A₂ (vasoconstritor e agregante plaquetário), serotonina (vasoconstritor), fator plaquetário 3 e cálcio, o que promove o recrutamento de plaquetas circulantes e a agregação plaquetária (CARLOS e FREITAS, 2007; CURNOW *et al.*, 2016; BERGER *et al.*, 2014).

A coagulação é um processo que ocorre devido a diversas interações que são responsáveis pela perda da característica fluida do sangue para ser convertido em uma massa semi-sólida, ou seja, um coágulo (CARLOS e FREITAS, 2007). A formação do coágulo de fibrina se dá por meio de complexas interações entre proteases plasmáticas, chamadas de fatores de coagulação, e seus cofatores, resultando na formação da enzima trombina que atua na conversão do fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel por meio de proteólise. O processo de coagulação era encarado como variadas interações proteína-proteína sequenciais denominada “cascata”, sendo dividida em duas vias: intrínseca e extrínseca que culminam em uma via comum. Esta hipótese foi proposta em 1964 por Macfarlane e Davie & Ratnoff e, apesar de, atualmente, este modelo ser visto como inadequado por não representar o *in vivo*, é considerado importante para questões didáticas (FRANCO, 2001). A hipótese mais aceita atualmente é um modelo que se baseia nas células, mostrando a importância da interação entre as proteínas plasmáticas e as superfícies celulares para o início da coagulação, sendo dependentes da ativação dos fatores de coagulação, assim como já era proposto. Este modelo se baseia em três etapas: iniciação, amplificação e propagação, em que o processo de coagulação é iniciado pelo fator tecidual (FT) (BERGER *et al.*, 2014).

O sistema fibrinolítico é o processo responsável pela dissolução do coágulo, fazendo com que a circulação sanguínea prossiga normalmente. Este processo é assim denominado, pois é o responsável pela degradação da fibrina estável por meio da atuação da plasmina, proveniente da proteólise do plasminogênio. Para a hemostasia, o processo de fibrinólise apresenta a mesma importância que o processo coagulante, pois favorecerá com que o sangue restabeleça sua característica fluida (CARLOS e FREITAS, 2007).

2.2 Modelo clássico da coagulação

Nesse modelo a coagulação ocorre por meio da proteólise de enzimas inativas (zimogênios), convertendo-as em enzimas ativas, as quais são essenciais para ativar outras enzimas da cascata e resultar na formação de trombina que, então, converte a molécula de fibrinogênio em fibrina. A cascata de coagulação, apresentada na Figura 1, é dividida em uma via extrínseca e uma via intrínseca, que convergem no ponto de ativação do fator X (“via final comum”) (SANTANA, 2014).

A via extrínseca está relacionada às lesões do vaso que liberaram extratos teciduais, envolvendo elementos que geralmente não estão no espaço intravascular. Esta é a primeira via na formação de trombina e ocorre através da exposição do FT na circulação, no local de lesão vascular, que se combina com a serinoprotease fator VII. Esse complexo, na presença de cálcio, ativa diretamente o fator X e pode também converter o fator IX em IXa sem a necessidade de cálcio. O FT é uma proteína de membrana que está presente sobre a superfície de muitos tipos de célula, mas não está em contato com a circulação. Portanto, ele somente é exposto quando há um dano vascular (FRANCO, 2001; CARLOS e FREITAS, 2007; RUTTMANN, 2006).

A via intrínseca é estimulada quando o sangue entra em contato com a superfície que foi lesada (RUTTMANN, 2006). Nesta via ocorre ativação por contato, quando plaquetas interagem com o colágeno exposto na superfície lesada *in vivo* ou por meio do contato com cargas elétricas negativas em superfícies *in vitro* (ADAMS *et al.*, 2009). Este processo requer outros componentes do plasma: pré-caliceína (uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (CAPM), um cofator não enzimático (FRANCO, 2001). A conversão da pré-caliceína para caliceína ativa o fator XII. O fator XIIa na presença do CAPM, converte o fator XI em fator XIa, que converte fator IX para IXa. O fator IXase une ao fator VIIIa e fator plaquetário 3 (FP3), na presença de cálcio, e ativa o fator X (RUTTMANN, 2006; CARLOS e FREITAS, 2007).

Ambas as vias culminam no ponto de ativação do fator X, iniciando a via final comum. O fator Xa combina-se com os fosfolipídios, teciduais ou liberados pelas plaquetas ativadas, como também com o fator V, formando o complexo ativador de protrombina que ativa a protrombina (fator II) em trombina (fator IIa). A principal ação da trombina é converter o fibrinogênio (fator I) em monômeros de fibrina, que se ligam covalentemente por meio de uma reação catalisada pelo fator XIIIa, formando

Com base nessas alterações, desenvolveu-se um modelo conceitual de hemostasia baseado em células, necessitando a participação de 2 tipos de células: as portadoras de FT e as plaquetas. O processo ocorre em 3 etapas distintas, mas superpostas: iniciação, na qual são geradas baixas quantidades de fatores coagulantes ativos; amplificação, na qual o nível de fatores de coagulação ativos é potencializado; e propagação, na qual fatores coagulantes se ligam às membranas altamente pró-coagulantes de plaquetas ativadas, e coágulos de fibrina são formados (VERSTEEG *et al.*, 2013; MONROE e HOFFMAN, 2006).

O processo de iniciação da coagulação ocorre devido a exposição do sangue a componentes que normalmente não se encontram no interior do vaso. Lesões vasculares ou alterações bioquímicas estimulam a expressão do fator tecidual (FT), o grande protagonista da iniciação da coagulação. O FT é uma glicoproteína que não é expressa normalmente em células que têm contato direto com o sangue, como células endoteliais e leucócitos. As células que apresentam expressão de FT constitutivamente são os fibroblastos subjacentes ao endotélio vascular, além disso, é encontrado também em queratinócitos, células epiteliais do trato respiratório e trato gastrointestinal, cérebro, células musculares cardíacas e glomérulos renais. Quando as células endoteliais e os leucócitos expressam o fator tecidual é em decorrência de lesão endotelial ou de estímulos, tais como endotoxinas e citocinas (TNF- α e interleucina-1). O FT, expresso em membranas celulares em contato com o plasma, se liga ao fator VIIa (FVIIa), formando o complexo FT/FVIIa ou complexo “protrombinase” extrínseco. O FVIIa normalmente apresenta níveis mínimos presentes na circulação, o que corresponde a 1% da concentração plasmática do fator VII (FVII) sem estar ativo. Quando o complexo FT/FVIIa é formado, este apresenta a capacidade de ativar os demais FVII presentes na circulação. Este complexo exibe a função enzimática ativa e tem como substrato o fator IX e o fator X, em que ao clivá-los torna-os ativos. Este processo resulta em quantidades mínimas de trombina e fibrina (FRANCO, 2001; VEERSTEG *et al.*, 2013).

Apesar do processo de iniciação resultar em baixo nível de trombina, esta é capaz de ativar as plaquetas, amplificando o processo de adesão plaquetária por meio da ativação dos fatores V (FV), VIII (FVIII) e o XI (FXI). Estas reações são de grande importância para a formação do complexo “tenase” intrínseco (fator IXa/fator VIIIa) na fase de propagação, que tem a função de ativar o fator X (com eficiência de 50 vezes a do complexo FT/FVIIa), e do complexo “protrombinase” (fator Va/fator Xa), que

converte a protrombina (fator II) em trombina (fator IIa). Ao final, a trombina promove a conversão do fibrinogênio em fibrina, resultando na ativação plaquetária e ativando o fator XIII, que estabiliza o coágulo de fibrina (FRANCO, 2001). Por meio desse modelo baseado na célula, é possível compreender o porquê a Hemofilia A ocasionada pela ausência do fator VIII apresenta um quadro hemorrágico bastante significativo em casos de lesões teciduais (VEERSTEG *et al.*, 2013).

2.4 Sistema fibrinolítico

O sistema fibrinolítico apresenta uma importância tão grande quanto o processo de coagulação, pois, é responsável pela dissolução do coágulo, fazendo com que a circulação sanguínea prossiga normalmente. Este processo é assim denominado, pois é o responsável pela degradação da fibrina estável (CARLOS e FREITAS, 2007). A calicreína consegue converter o plasminogênio em plasmina, no entanto, essa atividade é incerta *in vivo*. Os principais ativadores deste processo *in vivo* são: ativador do plasminogênio tissular (t-PA) e o ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA). O t-PA é uma serinoprotease produzida pelas células endoteliais em resposta à presença de trombina e oclusão venosa. O u-PA é ativada pela plasmina e por meio do contato com fatores como cininogênio, pré-calicreína e FXII (MARTINICHEN, 2005; ADAMS e BIRD, 2009). Ambos os ativadores têm alta especificidade de ligação com seu substrato (plasminogênio), hidrolisando uma única ligação peptídica (Arg560 – Val561), o que resulta na formação da plasmina (MARTINICHEN, 2005).

A plasmina degrada então a fibrina em fragmentos menores e os materiais restantes, como as plaquetas e os demais componentes do coágulo, são removidos pelos macrófagos do sistema retículo endotelial (CARLOS e FREITAS, 2007). A inibição do sistema fibrinolítico se dá pela ação específica de inibidores de ativadores de plasminogênio (PAI) e diretamente na plasmina ativa, por meio da serpina α 2-antiplasmina (BERGER *et al.*, 2014). A α 2-antiplasmina se liga à plasmina e a inativa, causando a perda da sua função. Outro componente importante nessa regulação é o inibidor da fibrinólise ativável por trombina (TAFI). Este é ativado pela trombina na presença de trombosmodulina e tem o papel de reduzir a ligação do plasminogênio ao coágulo de fibrina (CURNOW *et al.*, 2016).

2.5 Regulação da hemostasia

A coagulação sanguínea deve ser estritamente regulada de modo a preservar a hemostasia. Para que isso ocorra eficazmente, é necessário que o sistema esteja ativo apenas no local da lesão vascular e durante um período de tempo adequado (NORRIS, 2003). Essa regulação é mediada por uma série de proteínas e cofatores inibitórios (anticoagulantes naturais), seja por inibição enzimática ou modulação da atividade do cofator (CURNOW *et al.*, 2016; FRANCO, 2001; NORRIS, 2003). As moléculas que apresentam maior importância nesse processo são: o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), proteína C (PC), proteína S (PS), a antitrombina (AT) e o cofator II da heparina (FRANCO, 2001).

A iniciação da coagulação ocorre por meio do complexo TF/VIIa, que é um potente ativador tanto do fator IX quanto do X. O inibidor da via do fator tecidual (TFPI) é uma proteína responsável pela inibição deste complexo, limitando a formação de FXa e FIXa (FRANCO, 2001). Esta proteína é um inibidor de múltiplos domínios, formando inicialmente um complexo com FXa por meio de um domínio, que então, pode se ligar ao complexo TF/FVIIa, com outro domínio de ligação. O TFPI é sintetizado pelas células endoteliais, porém, em menor quantidade também pode ser sintetizada por megacariócitos, monócitos, fibroblastos e células sinoviais. A inibição causada na via extrínseca devido a essa proteína é rápida (NORRIS, 2003; MARTINICHEN, 2005).

A proteína C (PC) é uma proteína plasmática dependente de vitamina K e circula como um zimogênio inativo. Esta proteína, inicialmente, necessita se ligar ao seu receptor transmembrana expresso no endotélio (EPCR). Para que a PC seja ativada, a trombina precisa se ligar a outra proteína transmembrana presente no endotélio, a trombosmodulina (TM), que é expressa constitutivamente. A trombina complexada com a TM ativa a PC, que se dissocia da EPCR. A PC ativada (APC) cliva e inativa os fatores Va e VIIIa, com ação potencializadora da PS que atua como cofator não enzimático. Diante dessa situação, observa-se que a trombina, apesar de ter ação pró-coagulante, apresenta também um papel fundamental na regulação por ter uma ação anticoagulante quando tem ligação com a TM endotelial, ativando a via inibitória da PC (NORRIS, 2003; FRANCO, 2001).

A antitrombina (AT) é uma serpina circulante produzida pelo fígado. Provavelmente é o inibidor da coagulação com maior relevância *in vivo*. A sua

atividade é a inibição de diversas serinoproteases, principalmente da trombina e do FXa, além do fator XIa e fator IXa. A trombina ligada à AT forma o complexo estável trombina-antitrombina (TAT), que é rapidamente eliminado da circulação (CURNOW *et al.*, 2016). A AT e a heparina formam um complexo estável, produzindo uma alteração alostérica na AT, que torna seus resíduos de arginina mais disponíveis para interagir com o local ativo da serina em enzimas específicas ativadas (CASU, 2005).

O cofator II da heparina é uma serpina sintetizada no fígado que atua inibindo a ação da trombina, não sendo muito eficaz em inibir os demais fatores da coagulação (BATTY e SMITH, 2010). Esta molécula apresenta bastante similaridade com a AT, pois apresenta vários aminoácidos carregados positivamente que interagem com glicosaminoglicanos como a heparina. Por meio dessa interação, podem, então, se ligar à trombina (MARTINICHEN, 2005). Em casos de pacientes com diagnóstico de trombose, essa via de inibição pode ser bastante importante (CASU, 2005).

2.6 Distúrbios na coagulação

Todo o sistema de hemostasia é rigorosamente controlado, portanto, um defeito hereditário ou adquirido nesse sistema pode causar descompensação e sobrecarregar os processos internos, causando sangramento descontrolado ou trombose. Há muitas deficiências que são responsáveis por esse desequilíbrio incluindo defeitos de plaquetas, fatores de coagulação e/ou VWF (CURNOW *et al.*, 2016).

A trombofilia é a condição em que há uma predisposição para o desenvolvimento de trombose (PREVITALI *et al.*, 2011). A trombose arterial tem início devido a ruptura de uma placa aterosclerótica, que é composta pelo acúmulo de lipídeos e macrófagos na parede da artéria. Essa ruptura causa o recrutamento rápido das plaquetas por meio de receptores da superfície celular das plaquetas com o colágeno e o FVW (MAKCMAN, 2008). O tromboembolismo venoso (TEV) é a terceira principal causa de morte associada a doença vascular após infarto e acidente vascular cerebral (AVC). Esta doença acomete até 0,1% da população a cada ano, principalmente os idosos (ADAMS e BIRD, 2009). O TEV é representado por duas linhas clínicas diferentes: trombose venosa profunda e embolia pulmonar.

A trombose venosa profunda ocorre com maior frequência nas grandes veias das pernas e a embolia pulmonar geralmente é uma complicação deste quadro inicial, quando o trombo se rompe e viaja até os pulmões, se alojando em uma artéria

pulmonar impossibilitando o fluxo sanguíneo. Os trombos que foram formados nas veias são denominados de coágulos vermelhos devido a presença de hemácias nesses trombos, diferentemente do arterial que é denominado de trombo branco. O tromboembolismo venoso é ocasionado por alterações na composição do sangue que podem ter uma causa genética e/ou ambiental (MACKMAN, 2008). Alguns fatores genéticos associados são: mutação pontual no fator V de Leiden que ocasiona resistência à proteína C e mutação na protrombina (FII), o que resulta em um aumento da protrombina em 30%, favorecendo a formação de trombos (FERNANDES *et al.*, 2017). Fatores de risco adquiridos, sob influência do ambiente, para tromboembolismo venoso incluem câncer, obesidade e grandes cirurgias (MACKMAN, 2008).

As hemofilias, ao contrário das trombofilias, são caracterizadas pela deficiência na atividade coagulante, o que tem por consequência hemorragias. As hemofilias A e B são doenças raras ligadas ao cromossomo X e ocorrem devido a mutações no fator VIII e no fator IX respectivamente. Os indivíduos afetados podem apresentar sintomas graves, moderados e leves da doença. A hemofilia A é significativamente mais frequente do que a hemofilia B (FRANCHINI e MANNUCCI, 2017).

Existem variados outros exemplos de distúrbios da coagulação, os quais podem ser hereditários ou até mesmo adquiridos. Alguns exemplos destes distúrbios são: doença de Von Willebrand, um distúrbio hemorrágico hereditário em que há uma deficiência ou defeito envolvendo o FVW; deficiência do FXI, que também resulta em caso hemorrágico; coagulação intravascular disseminada (CIVD), tendo como gatilho várias circunstâncias distintas, ativando maciçamente a cascata de coagulação até ocorrer a depleção dos fatores de coagulação e culminar em sangramentos, além de variados outros distúrbios hemostáticos (LEUNG, 2014).

2.7 Testes laboratoriais da hemostasia

Os principais métodos para avaliação da coagulação sanguínea em laboratório são: o tempo de trombloplastia parcial ativada (aPTT) e o tempo de protrombina (PT). Esses modelos eram interpretados como a avaliação da via intrínseca e extrínseca respectivamente. Porém, com o novo modelo de coagulação, a compreensão acerca da avaliação dos resultados desses testes foi aperfeiçoada (FERREIRA *et al.*, 2010).

O PT é o tempo para formação de um coágulo a partir da adição do fator tecidual (tromboplastina ou FIII) e cálcio com plasma. Esse processo ativa o FVII,

causando ativação do FX, FII e formação de fibrina. Compreende-se que o PT avalia os níveis procoagulantes envolvidos na fase de iniciação da coagulação, onde os fatores da via extrínseca operam (fatores V, VII e X), identificando se há anormalidades com os mesmos. Como 3 desses fatores são vitamina K-dependentes, este é o teste de escolha para monitorização da anticoagulação com os antagonistas de vitamina K. O aPTT é o tempo de coagulação após a adição do ativador da fase de contato da coagulação, como por exemplo, sílica e de cefalina. Esta adição irá ocasionar a ativação dos FXII e FXI, culminando na ativação da via comum para formação de fibrina. Esse teste é utilizado para o diagnóstico de anomalias dos fatores intrínsecos (FXII, FXI, FIX, FVIII, FX, FII e FI) e é o método de escolha para monitoramento de pacientes que estão sob o uso de heparina não-fracionada (CARLOS e FREITAS, 2007; CLÉ *et al.*, 2010).

2.8 Anticoagulantes usados *in vivo*

Os anticoagulantes são medicamentos que têm a capacidade de reduzir a atividade de várias proteases na cascata de coagulação por meio da sua inibição direta, inibição da sua modificação pós-traducional ou aumentando a atividade de um anticoagulante endógeno. Uma modalidade de fármacos empregada há mais de 80 anos são os antagonistas de vitamina K (anticoagulantes orais). A varfarina é o maior representante dessa modalidade. O seu mecanismo de ação é a inibição de uma enzima carboxilase, que utiliza a vitamina K para a modificação de várias proteínas de coagulação (fator VII, fator IX, fator X e protrombina). A sua utilização está relacionada com tratamentos em longo prazo (MACKMAN, 2008). Porém, a sua utilização pode ser difícil em alguns casos, pois pode conferir interação com dieta e grande número de medicamentos, sendo necessário um acompanhamento rigoroso com ajustes de doses. Além disso, pode causar necrose de pele em pessoas com deficiência de antitrombina e de proteínas C e S, e alterações fetais em gestantes (YOSHIDA *et al.*, 2011).

A heparina é outro medicamento utilizado há longa data, principalmente em casos de cirurgia cardiovascular, para prevenção de tromboembolismo venoso. Ela também é usada em tubos de coleta sanguínea em análises clínicas. Ela se liga à proteína antitrombina e aumenta a capacidade desta de inibir o fator Xa e a trombina. A heparina fracionada (heparina de baixa massa molecular) foi introduzida no

mercado, pois a sua administração resulta em uma menor incidência de sangramento do que a heparina não fracionada. Existem também os pentassacarídeos sintéticos, como fondaparinux e idraparinux, que foram projetados com uma estrutura baseada na sequência de ligação da heparina à antitrombina, tendo como alvo principal o fator Xa, mas não a trombina (MACKMAN, 2008).

Atualmente, foram empregados também os inibidores diretos da trombina que ligam seletivamente e reversivelmente ao local ativo da trombina, inibindo a formação de fibrina e a propagação da formação de coágulos. Entre os representantes estão: desirudina, o argatroban e a bivalirudina. Eles são os principais agentes terapêuticos alternativos na trombocitopenia induzida pela heparina. Em 2004, o ximelagatrana foi licenciado pela Agência Europeia de Medicamentos e se tornou o primeiro inibidor da trombina oral a chegar ao mercado. Porém, devido a uma potencial hepatotoxicidade, ele foi retirado do mercado. Desde 2008, novos anticoagulantes orais foram introduzidos. Estes incluem o inibidor direto da trombina por via oral, o dabigatrano e os inibidores diretos do fator Xa por via oral, como o rivaroxabana, o apixabana e o edoxabano. Porém, estes são mais caros e não possuem antídotos (OBERHUBER e FILIPOVIC, 2016).

2.9 Anticoagulantes usados para coleta sanguínea

Os anticoagulantes são aditivos que inibem a coagulação, isto é conseguido pela ligação dos íons cálcio ou pela inibição de trombina. O soro de sangue coagulado é, em variados casos, o preferido para análise química clínica, mas o plasma, obtido com um anticoagulante apropriado, pode ser igualmente válido e, em certas condições, preferíveis ao soro. A utilização do soro apresenta algumas desvantagens como a espera de 15 a 30 minutos para a conclusão da coagulação antes da centrifugação, além disso, o rendimento plasmático do plasma é geralmente superior ao soro (MOHRI *et al.*, 2009).

Os anticoagulantes mais usados são o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), a heparina e o citrato (MOHRI *et al.*, 2009). O citrato de sódio é um quelante de cálcio que reage com o cálcio livre do sangue formando sais insolúveis. A ausência de cálcio livre impede a efetivação do mecanismo de coagulação sanguínea. Esse anticoagulante não preserva os eritrócitos, portanto o sangue deve ser utilizado em até 24 horas após a coleta. O EDTA reage, através de seus quatro radicais ácidos,

com o cálcio plasmático, formando um quelato, tornando-se insolúvel e também impedimento a coagulação. A heparina interfere nas etapas finais da cascata da coagulação, impedindo conversão da protrombina (fator II) em trombina, que, por sua vez, promove a conversão do fibrinogênio (fator I) em fibrina, originando o coágulo (SECCHI, 2010).

A solução de citrato de sódio é amplamente utilizada em estudos de coagulação, porque o efeito é facilmente reversível por meio da adição de Ca^{+2} . Porém, não é indicado para análises bioquímicas por causar saída de água das hemácias. Por outro lado, o EDTA é particularmente útil para o exame hematológico, pois mantém a sua integridade. Além disso, o EDTA apresenta baixo custo. Porém, este também apresenta algumas desvantagens como, por exemplo, diminuição do hematócrito e do volume corpuscular médio quando em excesso, e por não ser indicado para análise de cálcio, sódio, potássio, fosfatase alcalina (PA) e creatino fosfoquinase (CK). A heparina é o anticoagulante mais utilizado para análise de bioquímica clínica e gasometria. Esta apresenta algumas vantagens como não interferir na morfologia das células mesmo quando em excesso, sendo um anticoagulante mais versátil. Contudo, também apresenta desvantagens como interferência na coloração das células, aglutinação de leucócitos, custo e inibição da reação em cadeia da polimerase (PCR) (MOHRI *et al.*, 2009; ALVES, 2013).

2.10 Heparina

A heparina é um polissacarídeo encontrado nos grânulos dos mastócitos e apresenta muitas atividades que contribuem no desenvolvimento embrionário, resposta inflamatória, bacteriana, viral, entre outros. Porém, a sua principal atividade farmacológica é a ação anticoagulante que já vem sendo utilizada há mais de 100 anos (CHANDARAJOTI *et al.*, 2016).

A heparina pertence à família dos glicosaminoglicanos (GAGs) com peso molecular entre 3.000 a 30.000 g/mol (CHANDARAJOTI *et al.*, 2016). Ela é o anticoagulante mais antigo usado na medicina e muito estudado para diversas aplicações (ODUAH *et al.*, 2016). A heparina é um polissacarídeo linear que é constituído por sequências alternadas de dissacarídeo de um ácido urônico (L-idurônico ou IdoA e D-glucurônico ou GlcA) e um açúcar aminado (D-glucosamina ou

GlcN). No terminal redutor da cadeia, os componentes D-galactose (Gal) e D-xilose (Xil) são os únicos encontrados em heparinas purificadas. A ligação dos componentes IdoA e GlcN é α -(1→4) e do GlcA é β -(1→4). A GlcN apresenta-se com maior frequência *N*-sulfatada em comparação com *N*-acetilada e também apresenta-se, assim como os ácidos urônicos, *O*-sulfatada. Portanto, a heparina possui diferentes padrões de sulfatação que são distribuídos de maneira desigual ao longo de sua cadeia, dependendo da sua origem, como também do método de purificação. Embora o conteúdo em sulfato na heparina seja variável, aproxima-se de 2,5 resíduos por unidade dissacarídica (COELHO, 2004). Essa distribuição dos resíduos de sulfato ao longo da cadeia polissacarídica é importante para a interação da molécula com os inibidores de proteases e com enzimas do sistema de coagulação, para conferir a sua atividade anticoagulante (POMIN, 2009). A maior parte da heparina é constituída por repetição do dissacarídeotrissulfatado (DTS) IdoA-2SO₃ ligado a GlcN-2SO₃6SO₃. Estas regiões são muitas vezes denominadas de regiões regulares (Figura 2) e são as principais responsáveis pelas propriedades da heparina. Além disso, os resíduos de GlcA 2-*O*-sulfatado também já foram identificados em regiões regulares mesmo que com pouca frequência (CASU, 2005).

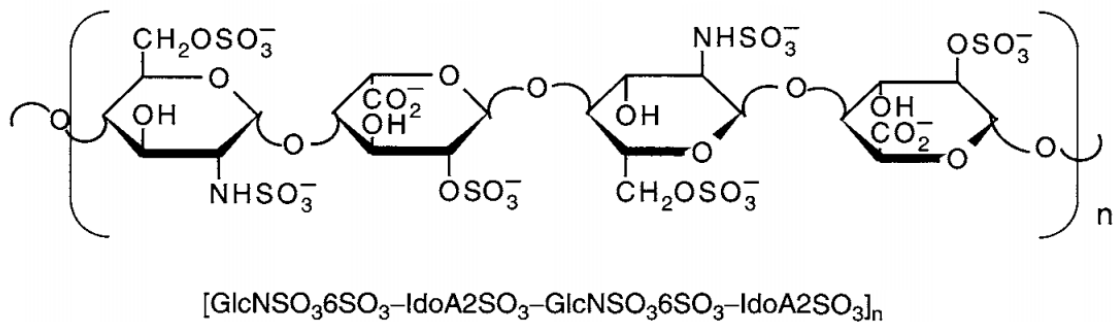


FIGURA 2- ESTRUTURA DA HEPARINA EM SUA REGIÃO REGULAR (*N*-sulfatada).
 FONTE: Casu (2005).

O principal mecanismo de ação da heparina está associado com a antitrombina (AT), formando um complexo estável, produzindo uma alteração alostérica na AT, que torna seus resíduos de arginina mais disponíveis para interagir com o local ativo da serina em enzimas específicas ativadas (CASU, 2005). Este complexo inibe principalmente os fatores Xa e IIa (trombina), como também outros fatores de coagulação como XIIa, XIa e IXa (ALBUQUERQUE e ALBUQUERQUE, 2001). A AT requer a presença de um pentassacarídeo exclusivo juntamente com pelo menos 18

resíduos de açúcar para sua ligação (Figura 3) (CHANDARAJOTI *et al.*, 2016). A heparina também pode inibir a trombina por meio do cofator II da heparina. Embora esta via não se apresente tão eficaz como inibidor dos fatores IXa, Xa, XIa, em casos de pacientes com diagnóstico de trombose, essa via de inibição pode ser bastante importante (CASU, 2005).

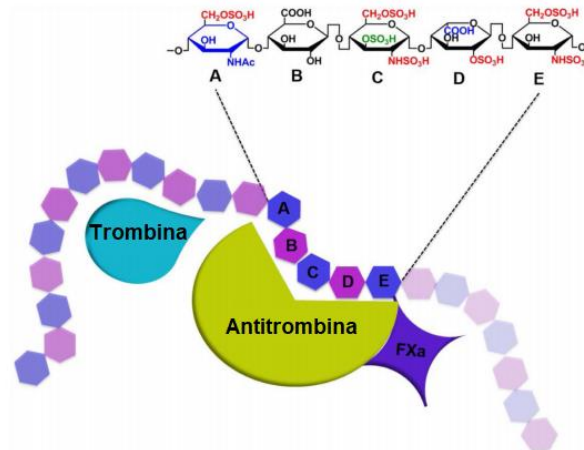


FIGURA 3- SEQUENCIA PENTASSACARÍDICA DA HEPARINA DE LIGAÇÃO À AT UNIDO ÀS 18 UNIDADES DE AÇUCARES.

FONTE: Chandarajoti *et al.* (2016).

Uma dificuldade em relação à heparina é que ela é um produto estruturalmente bastante heterogêneo e isso dificulta caracterizar funcionalmente seus domínios ativos necessário para a ação anticoagulante. Diante disso, nos anos 80, houve a introdução da heparina de baixo peso molecular (LMWH) com a finalidade de produzir um perfil de atividade mais previsível a fim de obter um agente antitrombótico mais seguro que efetivamente previna a trombose venosa, com um menor risco de hemorragia e uma diminuição da incidência de trombocitopenia induzida. Esse processo de despolimerização do polissacarídeo resultou em uma demanda menor de monitoramento e maior biodisponibilidade. Além disso, possibilitou menos reações adversas do que a heparina não fracionada. Em razão disso, a LMWH se tornou padrão de uso clínico, com exceção de uso em algumas situações como insuficiência renal e síndromes coronárias aguda (CASU, 2005; ODUAH *et al.*, 2016). Dentre os anticoagulantes mais utilizados na rotina clínica, a heparina é o que possui maior aplicação hematológica e bioquímica (ALVES, 2013).

2.10 Polissacarídeos sulfatados

Apesar da grande importância da heparina, esta apresenta algumas desvantagens como as complicações hemorrágicas, indução de trombocitopenia e diferenciação estrutural por apresentar uma estrutura bastante heterogênea, podendo levar a atividades farmacológicas distintas (ALBAN, 2002). Além disso, nos anos de 2007-2008 houve uma crise relacionada ao uso da heparina que exigiu melhorias na sua fabricação e abriu os horizontes para terapias alternativas (ODUAH *et al.*, 2016). Como a heparina é um material isolado do tecido animal, isto favoreceu a preocupação de contaminação, como por exemplo, por príons. Então, a partir de tais reflexões viu-se a necessidade de mais estudos para obtenção de uma terapia alternativa à heparina. Uma grande linha de pesquisa que está seguindo esse propósito é a de polissacarídeos sulfatados (ALBAN, 2002). Estes podem ser obtidos por meio de sulfatação química ou até mesmo naturalmente.

De início, foram buscados em tecidos animais polissacarídeos com atividade anticoagulante com estrutura semelhante a heparina. Os primeiros a serem analisados, foram os sulfato de condroitin e sulfato de dermatan. A partir de então, essas pesquisas foram ampliadas, tendo como estudo animais invertebrados e algas. A compreensão de que os grupos carregados negativamente, principalmente os grupos sulfato, apresentavam um papel relevante para a atividade, foi importante para que a investigação se expandisse também para os recursos químicos. Desse modo, surgiram análises da sulfatação química de polissacarídeos provenientes de fungos, plantas, etc (MESTECKINA e SCHERBUKHIN, 2010; OCHOA, 2017).

A atividade anticoagulante destes polissacarídeos é influenciada pela quantidade de grupos sulfato (DS), peso molecular e distribuição da densidade de carga ao longo da cadeia. Resultados de diversos estudos mostram que cada tipo de polissacarídeo quimicamente sulfatado é capaz de formar um complexo específico com os inibidores dos fatores de coagulação, potencializando a ação destes, não havendo um padrão regular para a promoção da atividade anticoagulante (MESTECKINA e SCHERBUKHIN, 2010).

2.11 Farinha de soja

A farinha de soja é extraída do grão de soja deslipidificado e torrado, que foi moído e peneirado. É um produto industrial da extração de óleo, sendo rico em proteínas e polissacarídeos (CIPRIANI *et al.*, 2009). Apesar da farinha de soja ser o produto menos refinado da soja, é um produto muito importante, pois apresenta ampla utilização no mercado alimentício, enriquecendo alimentos, como na panificação (RIGO, 2015).

O componente em maior proporção analisado após extração com água fervente é a arabinogalactana do tipo I (AGI), com peso molecular médio de 124.000 g/mol (CIPRIANI *et al.*, 2009). Este heteropolissacarídeo apresenta uma cadeia principal de β -(1 \rightarrow 4) D-galactopiranosose (Gal_p) com algumas ramificações em O-3 contendo α -(1 \rightarrow 5) L-arabinofuranose (Ara_f), sendo conhecida como arabinogalactana do tipo I da soja (Figura 4). A razão de arabinose para galactose é aproximadamente de 1:2,8, mas menores razões também são encontradas entre 1:1,5–1:2,0 (JOHNSON *et al.*, 2008). O tipo II de arabinogalactana consiste em uma cadeia principal de β -(1 \rightarrow 3) D-galactopiranosose com substituições em O-6 de β -(1 \rightarrow 6) D-galactopiranosose (CIPRIANI *et al.*, 2009) (SANTANA, 2014).

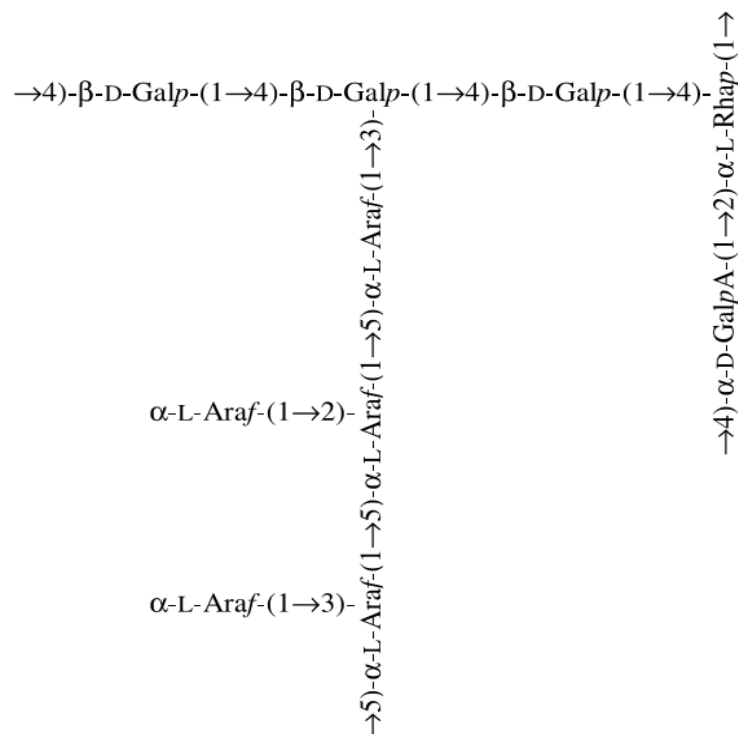


FIGURA 4- ESTRUTURA DA ARABINOGLACTANA DO TIPO I PROVENIENTE DA FARINHA DE SOJA.

FONTE: Cipriani *et al.* (2009).

A AGI apresenta capacidade de estabilização de emulsões. A aplicação deste polissacarídeo na biomedicina apresenta algumas características interessantes particularmente para o tratamento do câncer e imunorregulação. Estudos mostram que a injeção de uma dose da AGI proveniente da soja (50-400 mg/mL) conjuntamente com ciclofosfamida nos camundongos com Sarcoma S180 poderia melhorar significativamente os parâmetros das funções imunológicas, incluindo o número de leucócitos, o nível de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e a proporção de CD4⁺/CD8⁺, em comparação com o uso isolado de ciclofosfamida. Além disso, há hipóteses também de que pode conferir benefícios para a prevenção ou o tratamento de doenças relacionadas com a oxidação ou a inflamação, como doenças neurodegenerativas, *diabetes mellitus* ou doenças renais, pois, este polissacarídeo exibe atividades antioxidantes bastante relevantes (JIA *et al.*, 2015). Outro estudo também comprova o efeito gastroprotetor da AGI de soja, inibindo as lesões gástricas induzidas pelo álcool (CIPRIANI *et al.*, 2009). Visto isso, o polissacarídeo extraído da farinha de soja pode representar grandes funções, e é altamente disponível, sendo bastante promissor o uso desta molécula para estudos de sulfatação química e avaliação da atividade anticoagulante.

3 OBJETIVO E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo

Obtenção de agente anticoagulante a partir da sulfatação química da arabinogalactana proveniente da farinha de soja, para utilização em coleta de sangue em laboratório clínico.

3.2 Objetivos Específicos

- Extrair e purificar a arabinogalactana da farinha de soja.
- Sulfatar quimicamente a arabinogalactana da farinha de soja.
- Analisar a estrutura química da arabinogalactana quimicamente sulfatada.
- Avaliar a atividade anticoagulante *in vitro* por aPTT da arabinogalactana sulfatada.
- Avaliar o efeito da arabinogalactana quimicamente sulfatada em coletas de sangue, para análises de rotina de laboratório clínico (hemograma completo, perfil lipídico, perfil glicêmico, aminotransferases, gama-glutamil-transferase, uréia, creatinina, proteínas totais e bilirrubinas).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Farinha de soja VITAO®, lote 160520, comprada no supermercado local da cidade de Curitiba/ PR (BR).

4.2 Extração e purificação

O processo de extração e purificação da arabinogalactana tipo I de soja foi realizado de acordo com Cipriani *et al.* (2009), com algumas modificações e está resumidamente ilustrado na Figura 5. Foram utilizados 500g de farinha de soja para 5 L de água destilada (100 g/L). Esta mistura foi aquecida à aproximadamente 80 °C durante 1 h. O material resultante foi filtrado com coador de pano, a massa retida foi descartada e o filtrado armazenado. Depois, o filtrado foi centrifugado durante 20 minutos a 8000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante resultante foi rotaevaporado até 500 mL e, posteriormente, precipitado com etanol 99% gelado (x 3 vol.). O excesso de etanol foi retirado e descartado e a amostra passou por nova centrifugação (20 min a 8.000 rpm). O precipitado foi dissolvido em aproximadamente 400 mL de água destilada e submetido ao procedimento de congelamento e degelo três vezes, seguidos de centrifugação por 20 min a 8.000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante (PBS) e o precipitado obtidos desse processo foram liofilizados e pesados. O PBS foi diluído em água destilada (20 g/100 mL) e dialisado em membrana de 100.000 g/mol durante 3 dias em um sistema fechado, com troca de água destilada 3 vezes ao dia. O material retido nesse processo foi então rotaevaporado, liofilizado e pesado. Depois desse procedimento, a amostra passou por precipitação com ácido tricloroacético (TCA) 10% em igual volume, resultando em uma concentração final de 5% e, então, centrifugada, para eliminação de proteínas. O sobrenadante foi separado, neutralizado com NaOH 50% e dialisado em membrana de 6.000-8.000 g/mol durante 2 dias em sistema fechado, com troca de água destilada 3 vezes ao dia. Por fim, o material retido nessa diálise foi liofilizado e pesado, sendo esse o material final de trabalho, denominado AG.



FIGURA 5 – ESQUEMA DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ARABINOGALACTANA PROVENIENTE DA FARINHA DE SOJA.

4.3 Sulfatação química

A arabinogalactana (AG) da farinha de soja foi sulfatada conforme o método de Larm *et al.* (1979), adaptado por Román *et al.* (2016), gerando a fração AGS. O processo consiste em solubilizar AG em N,N-dimetilformamida (10:1 p/v; mg/mL) juntamente com complexo de sulfato de piridina, numa relação molar de 18 moles de complexo piridina sulfato/mol de OH livre do polissacarídeo. Após, a solução foi mantida em sistema fechado sob agitação por 6 h a 30 °C. Depois desse período, a solução foi neutralizada com NaHCO₃ 10% e, posteriormente, dialisada em sistema fechado por aproximadamente 3 dias, com água destilada trocada 3 vezes ao dia. Então, a solução foi concentrada em rotaevaporador, congelada e liofilizada. O cálculo da quantidade de OH livre do polissacarídeo é baseado na análise de metilação previamente realizada do polissacarídeo de estudo. Porém, neste caso, não foi possível realizar a análise de metilação. Portanto, o cálculo da quantidade de OH livre do polissacarídeo teve como base a análise de metilação de estudos presentes na literatura referentes ao mesmo polissacarídeo (CIPRIANI *et al.*, 2009).

4.4 Análise Estrutural

4.4.1 Dosagem de Ácidos Urônicos

A quantidade de ácidos urônicos dos polissacarídeos foi determinada segundo Filisetti Cozzi e Carpita (1991), comparando com uma curva padrão de ácido

galacturônico. Foram misturados 0,4 mL de uma solução contendo uma quantidade conhecida de polissacarídeo, 40 µL de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6) e 2,4 mL de tetraborato de sódio (75 mM em H₂SO₄). A mistura foi incubada em banho maria fervente por 20 min e após o resfriamento dos tubos, foram adicionados 80 µL de metahidroxibifenila (0,16% p/v em NaOH 0,5% p/v). A presença de ácidos urônicos foi visualizada pelo aparecimento de coloração rósea lida em espectrofotômetro a 525 nm.

4.4.2 Análise de Proteínas

A quantidade de proteínas presente na amostra foi mensurada pelo método colorimétrico adaptado de Bradford (1976). Este ensaio tem por princípio a alteração de coloração, de marrom para azul, do corante de Coomassie, devido a sua ligação com aminoácidos em condições ácidas. Para isso, foram incubados em triplicada, 50 µL de amostra ou de padrão de albumina (1 - 10 µg) ou de água destilada (branco), com 250 µL do reagente de Bradford em placa de 96 poços. Após 5 minutos, a presença de proteínas foi determinada pela alteração de absorvância a 595 nm.

4.4.3 Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Eficiência (HPSEC) e Determinação da Massa Molar (M_w)

As análises são realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência, equipado com quatro colunas de gel permeação, com limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ Da dispostas em série, e com detectores de índice de refração, UV 280 nm e de espalhamento de luz laser de multiângulos. O eluente é uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂) 0,1 M, contendo 200 ppm de azida de sódio (NaN₃), com um fluxo de 0,6 mL/min. Para determinação da homogeneidade da amostra, a mesma (1 mg/mL) foi solubilizada na solução utilizada como eluente e filtrada em membrana de acetato de celulose com poros de 0,22 µm. O volume de injeção é de 100 µL. Para determinação da massa molecular (M_w) de polissacarídeos, seus tempos de eluição foram comparados com tempos de eluição em HPSEC de uma curva padrão de dextranas com massas moleculares conhecidas (5.000 – 2.000.000 g/mol).

4.4.4 Composição Monossacarídica

As composições monossacarídicas foram determinadas após a hidrólise de 2 mg dos polissacarídeos com 1 mL de TFA 2 M, a 100 °C, por 8h. As soluções foram evaporadas até a secura e o resíduo dissolvido em 1 mL de H₂O destilada e reduzido com 2 mg de NaBH₄. Após 18h, ácido acético foi adicionado até a solução atingir o pH 7. A solução foi evaporada até secura e, posteriormente, lavada por repetidas evaporações com metanol (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Os alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1 v/v; 0,5 mL), a temperatura ambiente, *overnight*. A reação é interrompida pela adição de 1 mL de água destilada e os acetatos de alditóis gerados foram extraídos com clorofórmio, os quais foram lavados com solução aquosa de CuSO₄ a 5% até eliminação total da piridina residual. A fase clorofórmica foi, então, desidratada com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada à temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). Os acetatos de alditóis foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons. A análise foi realizada em um cromatógrafo GC-2010 Plus vinculado a espectrômetro de massa triplo quadrupolo TQ 8040 (Shimadzu) equipado com um amostrador automático Combipal (AOC 5000). A separação foi realizada com a coluna capilar SH-Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm d.i.). A temperatura foi programada de 100 °C a 280 °C com aumento de 10 °C/min totalizando 30 minutos de análise. O injetor foi mantido a 250 °C e Hélio 5.0 a 1 mL/min foi usado como gás de arraste. As amostras foram dissolvidas em n-hexano com injeção de 1 µL.

4.4.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Foi utilizada uma placa CCD Silica Gel 60 F252 marca EMD para o ensaio. Nesta placa é separado 1 centímetro (cm) na parte inferior para marcação dos nomes e aplicação dos padrões e amostra. Para cada amostra são delimitados 0,5 cm com intervalo de 0,2 cm entre elas. A placa é deixada na estufa por 100 °C por 10 minutos para ativação. Por meio de capilares, os padrões e a amostra foram aplicados nos seus respectivos espaços. Depois de secos, a placa foi colocada cuidadosamente na cuba pré-saturada com a fase móvel (acetato de etila:ácido acético:1-propanol:água – 4:2:2:1). Ao final da corrida do solvente, a placa foi colocada na estufa até secar.

Após secar, a placa foi mergulhada rapidamente em solução de orcinol (250 mg de orcinol em 95 mL de etanol):H₂SO₄ (5 mL) e seca na estufa a 100 °C por aproximadamente 3 minutos para revelação.

4.4.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C

Espectros de RMN do tipo HSQC-DEPT 135 são obtidos em espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE III (9,6 Tesla) operando a 400.13 MHz para ¹H, com *probe* inversa de 5 mm de diâmetro, do Centro de RMN do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da UFPR. Os polissacarídeos (±20 mg) foram solubilizados em 500 µL de óxido de deutério (D₂O) e analisados a 50 °C. Acetona foi utilizada como referência interna (δ 30.2/2.22; ¹³C/¹H, respectivamente). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm.

4.4.7 Dosagem de Sulfato

A dosagem de sulfato foi realizada pelo método turbidimétrico de Dodgson e Price (1962). Foram dissolvidos 200 mg de gelatina incolor em 40 mL de água destilada aquecida a 60-70 °C (5 mg/mL). A solução de gelatina foi mantida na geladeira *overnight*. Uma quantidade de 200 mg de cloreto de bário foi adicionado à mistura, que foi mantida novamente na geladeira durante 2-3 h. A hidrólise é realizada com HCl 1 N (1mg/mL) a 105–110 °C durante 5 h. Então, 200 µL da solução hidrolisada foi tratada com 3,8 mL de ácido tricloroacético (TCA) 3% e 1 mL de solução de cloreto de bário-gelatina. Depois de 15 min, a absorvância foi determinada em espectrofotômetro (360nm). O teor de sulfato foi relacionado com uma curva padrão de sulfato de sódio (20 a 180 µg/mL) e o grau de substituição dos polissacarídeos por grupos sulfatos, calculado conforme a fórmula de Whistler e Spencer, 1964:

$$DS = \frac{Y \times S}{3200 - (102 \times S)}$$

Onde:

Y = massa molar média das unidades monossacarídicas da fração

3200 = massa atômica do enxofre (32 g) x 100

102 = representa 1 mol do éster substituinte (SO₃Na)

S = representa o teor de enxofre dado em porcentagem

4.5 Atividade anticoagulante *in vitro*

4.5.1 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT)

O aPTT é um teste *in vitro* que verifica o efeito no mecanismo intrínseco da coagulação. A análise foi realizada em coagulômetro COAG-A-MATE[®] XM (Organon Teknika Corporation, Durhan, NC), utilizando o kit HemosiL[®] para aPTT (Instrumentation Laboratory). Plasma ovino citratado (50 µL) foi incubado a 37 °C com solução salina, polissacarídeo quimicamente sulfatado ou heparina por 20 s (50µL). Em seguida, cefalina de coelho foi adicionada (50 µL). E, após 150 s, CaCl₂ a 25 mM (50 µL) foi adicionado e o tempo de coagulação determinado. Cada amostra foi analisada em quadruplicata.

4.6 Avaliação da possibilidade de utilização de AGS como anticoagulante em coleta de sangue para análises clínicas

Este teste teve por objetivo analisar se o polissacarídeo sulfatado apresentará capacidade de manter o sangue nos tubos de coleta sanguínea fluído até o momento da análise sem conferir alterações nos resultados dos exames. Para tanto, um teste piloto foi realizado com coleta de sangue de 1 rato macho *Wistar*, via carótida, e transferidos 2 mL para tubos de coleta contendo diferentes volumes (seringa molhada, 20 µL e 40 µL) de polissacarídeo sulfatado (35 mg/mL) ou seringa molhada de heparina sódica 5000 UI/mL (controle positivo). Os tubos foram mantidos em geladeira e observados quanto a fluidez sanguínea, por pelo menos 72h. Com isso, o volume de melhor desempenho como anticoagulante foi o escolhido. O ensaio definitivo foi realizado com n = 7, de ratos *Wistar* machos com peso entre 210 a 330 gramas, em que foi feita 1 coleta de 4 mL por animal, onde 2 mL foram destinados ao tubo contendo o polissacarídeo sulfatado e os outros 2 mL ao tubo contendo EDTA. Cada tubo foi enviado ao Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná para ser analisado quanto ao hemograma completo, perfil lipídico, perfil glicêmico, AST, ALT, GGT, uréia, creatinina, proteínas totais e bilirrubinas. A análise estatística realizada levou em consideração a média dos grupos e seus desvios padrões, utilizando o Teste

t de Student. Os grupos que apresentaram valores de p inferiores a 0,05 foram considerados com diferenças estatisticamente significativas. O projeto seguiu todas as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e teve aprovação (registro nº 1038) do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPR (CEUA - UFPR).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e análise estrutural do polissacarídeo quimicamente sulfatado (AGS)

O processo inicial de manuseio da farinha de soja apresentou algumas dificuldades por ser um material bastante fino. Desse modo, a tentativa de filtrar a amostra, depois da extração aquosa, por meio de um sistema de funil de Büchner acoplado a uma bomba a vácuo falhou por entupimento dos poros do papel de filtro. Diante essa situação, foi utilizado um coador de pano para filtrar a maior parte do resíduo sólido da extração aquosa e, em seguida, o restante do resíduo foi separado por centrifugação. Posteriormente, o extrato aquoso passou por processos de congelamento e degelo.

Por meio do método de congelamento e degelo, o material foi separado entre sobrenadante (PBS) e precipitado (PBI). A recuperação da farinha de soja (500 g) foi de 30,98 g (16,14%) de PBS e de 2,96 g (0,6%) de PBI. O rendimento da fração PBS poderia ter sido maior se não fosse pela percepção de fermentação em parte do material durante o procedimento de congelamento e degelo. Posteriormente, a fração PBS passou por diálise em membrana de 100.000 g/mol para eliminar componentes de menor massa molecular, tendo como recuperação do material retido 2,74 g denominado de PBS100. Após, esta fração passou por precipitação com TCA 10% (v/v) para separação de proteínas, resultando em uma recuperação final de 503 mg de material purificado (16,67%; Tabela 1) denominado AG. Da fração AG, 400 mg foram sulfatadas quimicamente, obtendo-se a fração AGS, tendo uma recuperação final de 427 mg (106,75%; Tabela 1). Justifica-se o rendimento superior a 100%, uma vez que houve inserção de grupamento sulfato na sua estrutura do polissacarídeo.

TABELA 1- RECUPERAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS AG E AGS.

MATERIAL DE PARTIDA	PROCESSO	MATERIAL RESULTANTE	RECUPERAÇÃO (%)
Farinha de soja (500 g)	Extração e Purificação	AG (0,503 g)	0,1%
AG (0,400 g)	Sulfatação química	AGS (0,427 g)	106,75%

A análise de proteínas foi realizada inicialmente com as frações PBS e o PBI. A quantidade de proteínas presentes foi de 3,03% e 11,9%, respectivamente. Portanto, o processo de gelo e degelo foi capaz de diminuir a quantidade de proteínas presentes na fração de interesse (PBS). Após a diálise em membrana de retenção de 100.000 g/mol, a análise de proteínas foi realizada novamente e a presença de proteínas aumentou para 19,8% na fração PBS100. Após a precipitação com TCA 10%, foi realizada novamente a análise de proteínas, tendo a fração AG a presença de 2,14% de proteínas apenas.

A dosagem de ácidos urônicos foi realizada com as frações PBS, AG e AGS. O teor de ácidos urônicos foi de 1,67%, 21,25% e 14,75%, respectivamente. O ácido urônico presente nas frações AG e AGS foi identificado como sendo ácido galacturônico, de acordo com análise, do material previamente hidrolisado, em Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (Figura 6). Além disso, por meio da CCD, nota-se que ambas as frações apresentaram galactose e arabinose, sendo, portanto, correspondentes a uma arabinogalactana, além de ramnose e xilose, em menor proporção.

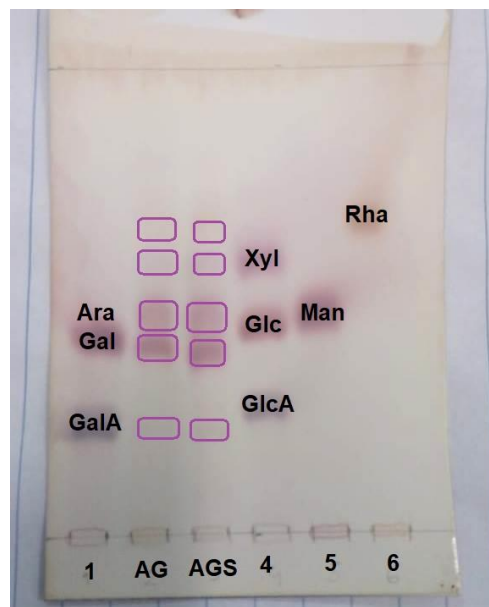


FIGURA 6 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) DAS FRAÇÕES AG E AGS APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA.

NOTAS: Ara: arabinose; Gal: galactose; GalA: ácido galacturônico; Xyl: xilose; Glc: glucose, GlcA: ácido glucurônico; Man: manose; Rha: ramnose. Região 1,4,5 e 6 são os padrões.

O perfil de eluição em HPSEC das amostras AG e AGS está representado na Figura 7. Conforme a análise, o perfil não se apresentou homogêneo em nenhuma

fração. Ambas as frações apresentam dois picos principais, sendo que em AG, a massa molecular calculada para o pico que eluiu primeiro foi de 56.140 g/mol e para o pico que eluiu por último foi de 5.510 g/mol, respectivamente, e em AGS, 49.970 g/mol e 9.090 g/mol, respectivamente.

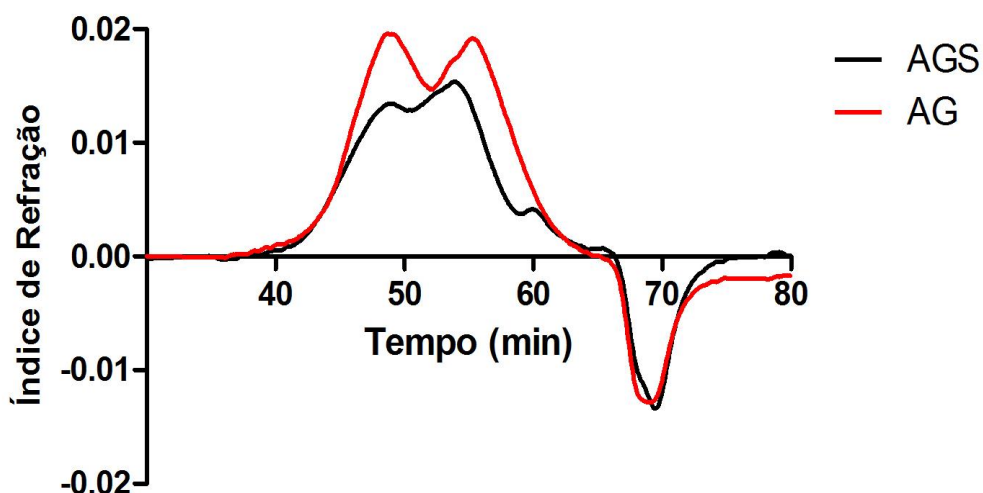


FIGURA 7- PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES AG e AGS.

O resultado da composição monossacarídica da amostra AG e AGS está representado na Tabela 2. A composição monossacarídica manteve-se semelhante entre as frações AG e AGS, tendo uma proporção grande de galactose, arabinose e ramnose e ácido galacturônico em suas estruturas.

TABELA 2- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES AG E AGS.

Frações	Composição Monossacarídica							
	Ramnose	Fucose	Arabinose	Xylose	Manose	Glucose	Galactose	GalA
AG	14,6%	3,9%	18,9%	2,6%	7,6%	3,2%	28,0%	21,2%
AGS	17,4%	2,3%	20,4%	6,7%	5,0%	4,2%	29,2%	14,8%

NOTA: Hidrólise com TFA 2 M, 100 °C durante 8h. Monossacarídeos derivados a acetatos de alditóis e analisados por GC-FID. O teor de ácido galacturônico (GalA) foi determinado pelo método colorimétrico de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

O grau de substituição por grupos sulfatos (DS), que representa a quantidade de grupos sulfato por unidade monomérica, encontra-se na Tabela 3. A partir dele podemos constatar que a fração AGS foi moderadamente sulfatada, apresentando um DS de 0,39.

TABELA 3- DOSAGEM DE SULFATO DA AMOSTRA AGS.

Fração	%S	DS
AGS	6,37	0,39

NOTAS: %S (Percentagem de enxofre determinado pela fórmula descrita por Whistler e Spencer (1964). DS (Grau de substituição por grupos sulfato) determinado pelo método turbidimétrico de Dodgson e Price (1962).

A análise de HSQC-DEPT 135 da fração AG ilustrada na Figura 8 mostrou correlações de $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ características com arabinogalactana do tipo I tanto na fração AG como em AGS. As correlações $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ na região de carbono anomérico referentes a $\alpha\text{-L-Araf}$ se apresentaram em δ 107,4/5,05 ppm e δ 108,8/5,23 ppm na fração AG e em δ 107,6/5,05 ppm e δ 109,0/5,22 ppm na fração AGS. As correlações de $\beta\text{-D-Galp}$ se evidenciam em δ 103,0/4,46 ppm na fração AG e em δ 103,1/4,43 ppm e δ 102,8/4,51 ppm na fração AGS. Ambas as amostras também apresentam correlações de C-6/H-6 de $\alpha\text{-L-Rhap}$ em δ 16,79/1,24 ppm na fração AG e em δ 16,4/1,29 ppm na fração AGS (não mostrados nos espectros). Além disso, ao aumentar a intensidade do espectro, na região anomérica percebe-se a presença de correlações de $\alpha\text{-L-Rhap}$ em δ 98,39/5,09 e de $\alpha\text{-D-GalAp}$ em δ 97,6/5,0 e δ 99,8/4,73 ppm para AG e de $\alpha\text{-L-Rhap}$ em δ 98,79/5,19 e de $\alpha\text{-D-GalAp}$ em δ 99,33/5,05 e δ 99,7/4,71 ppm para AGS, correspondendo com o resultado da CCD. Em geral, os espectros de AG e AGS ficaram bastante semelhantes, com diferenças discretas de deslocamento de sinal na fração AGS devido a inserção dos grupamentos sulfato, principalmente em δ 83,81/4,10 e δ 73,5/3,87 ppm. Portanto, o espectro de AGS corresponde com o resultado da dosagem de sulfato (DS=0,39), representando uma moderada inserção de grupamento sulfato na estrutura de AG. Análises de metilação deverão ainda ser realizadas para a identificação das posições de inserção de grupos sulfato em AGS.

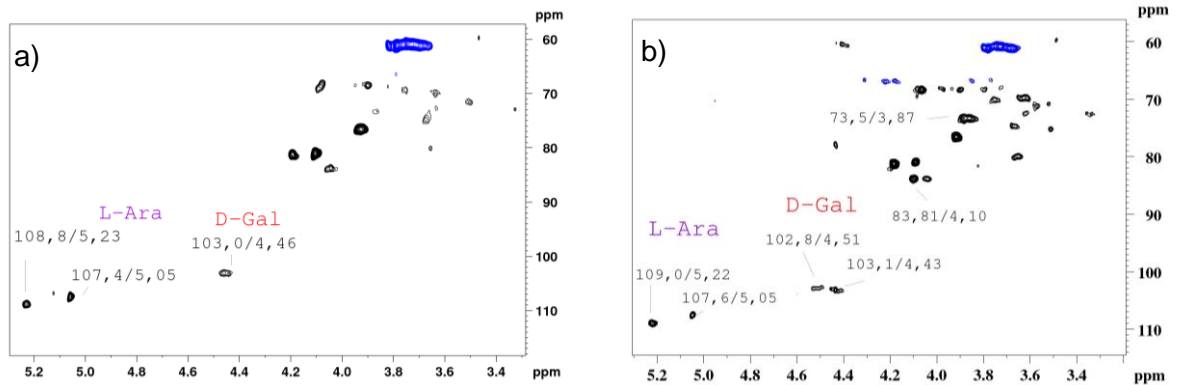


FIGURA 8 - ESPECTRO DE HSQC-DEPT 135 DA FRAÇÃO AG (a) e AGS (b) EM D₂O À 50°C.

NOTAS: Calibração com acetona em $\delta_{30.2/2.22}$ (¹³C/¹H), correlações positivas em preto, e negativas em azul.

5.2 Avaliação da possibilidade de utilização de AGS como anticoagulante em coleta de sangue para análises clínicas

Após a confirmação relativa à inserção dos grupamentos sulfato, a fração AGS foi submetida ao teste *in vitro* de aPTT (Figura 9) para verificar a existência de atividade anticoagulante. A fração AGS foi capaz de aumentar o tempo de aPTT em 6,89 vezes (a 50 µg/mL) e a heparina em 4,12 vezes (a 3,5 µg/mL) quando comparados ao controle negativo (salina; aPTT= 22,33 s). A amostra AGS teve uma atividade anticoagulante elevada na faixa de concentração de 20 – 50 µg/mL, aumentando o tempo de aPTT em mais de 2,5 vezes em relação ao controle negativo. Com base na relação entre os coeficientes angulares obtidos a partir destes resultados, a heparina é aproximadamente 15 vezes mais potente que AGS.

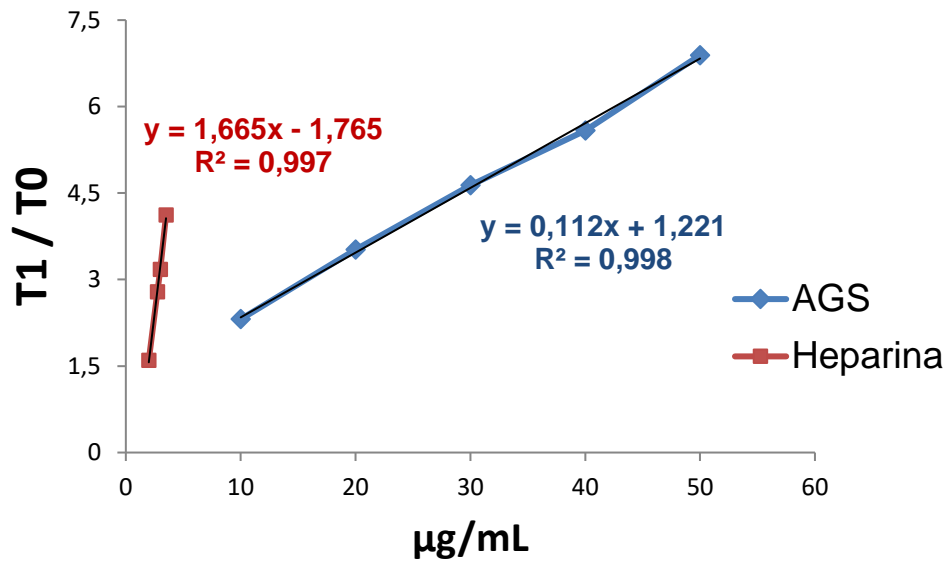


FIGURA 9 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DA FRAÇÃO AGS E HEPARINA.

NOTAS: Os resultados foram expressos como a média do T1/T0 (n=4): razão entre o aPTT da amostra (T1) e o aPTT da salina (T0 = 22,33 s).

Para a avaliação da possibilidade de utilização de AGS como anticoagulante em coleta de sangue para análises clínicas, inicialmente foi determinada a quantidade de AGS necessária nos tubos de coleta para evitar a coagulação do sangue por um período de tempo adequado para a realização das análises bioquímicas e hematológicas (3 dias ou mais). Diferentes volumes de uma solução saturada de AGS (35 mg/mL) foram utilizados em tubos de coleta, num ensaio preliminar de avaliação de capacidade anticoagulante. Para um volume de 2 mL de sangue, foram necessários 40 µL da solução saturada de AGS para evitar a coagulação do sangue coletado, por pelo menos 3 dias, sendo esta a quantidade de AGS utilizada nos demais ensaios.

Posteriormente, a possibilidade de utilização de AGS como anticoagulante para viabilizar análises clínicas foi avaliada por meio da realização de diversos ensaios bioquímicos e hematológicos, com amostras de sangue de ratos machos Wistar coletadas na presença de AGS ou EDTA, este último sendo um anticoagulante utilizado de rotina em análises clínicas. As comparações dos resultados obtidos em presença de AGS e EDTA, para os ensaios bioquímicos e hematológicos, são apresentadas nas Figuras 10 e 11, respectivamente. A determinação de gamaglutamiltransferase (GGT), inicialmente prevista, não foi realizada, pois as

amostras contendo AGS apresentaram hemólise, impossibilitando a realização do exame.

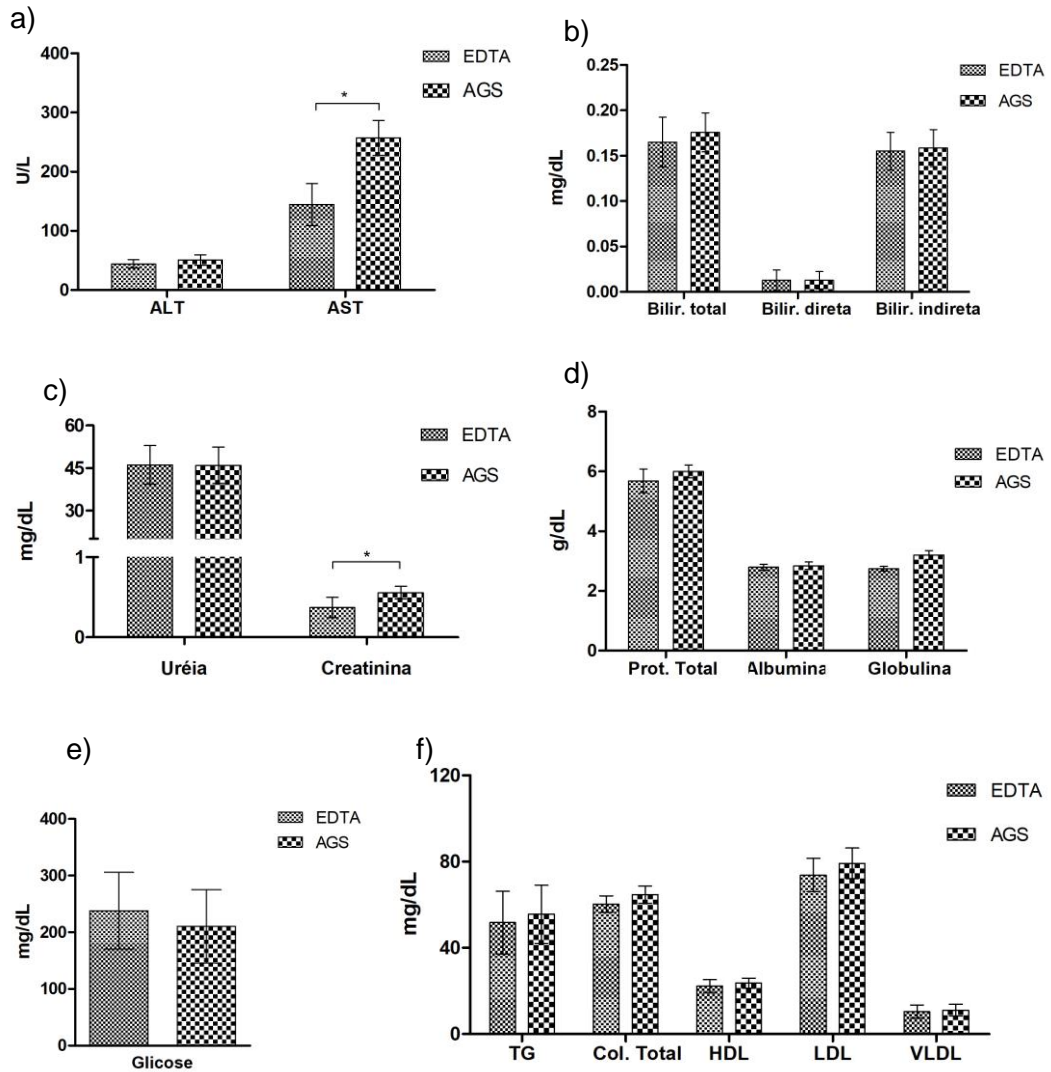


FIGURA 10 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS BIOQUÍMICOS DAS AMOSTRAS DE SANGUE COLETADAS COM EDTA E COM AGS.

NOTAS: a) Alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em U/L; b) Bilirrubina total, bilirrubina direta e bilirrubina indireta em mg/dL; c) Ureia e creatinina em mg/dL; d) Proteína total, albumina e globulina em g/dL; e) Glicemia em mg/dL; f) Perfil lipídico: triglicerídeos (TG) em mg/dL, colesterol total em mg/dL, HDL, LDL e VLDL em mg/dL. Os resultados foram expressos como a média \pm DP (n=7) e comparados pelo teste t, sendo considerados diferentes estatisticamente para valores de *p<0,05.

Quando comparados os resultados bioquímicos das amostras de sangue coletadas dos mesmos animais com o controle (EDTA) e com AGS (Figura 10), nota-se uma significativa diferença na determinação de AST e creatinina. A maior atividade da AST nas amostras coletadas com AGS pode ser justificada pela hemólise que foi

observada. A AST está presente em grandes quantidades nos eritrócitos e a hemólise leva a um aumento da sua concentração no plasma (BASTOS *et al.*, 2010). O maior teor de creatinina sérica pode estar relacionado também com a hemólise, visto que elementos cromogênicos presentes dentro das células podem interferir na leitura da absorbância ótica, ocasionando uma superestimação da creatinina (LIPPI *et al.*, 2006). Contudo, os resultados dos demais parâmetros bioquímicos avaliados foram semelhantes para os dois anticoagulantes utilizados.

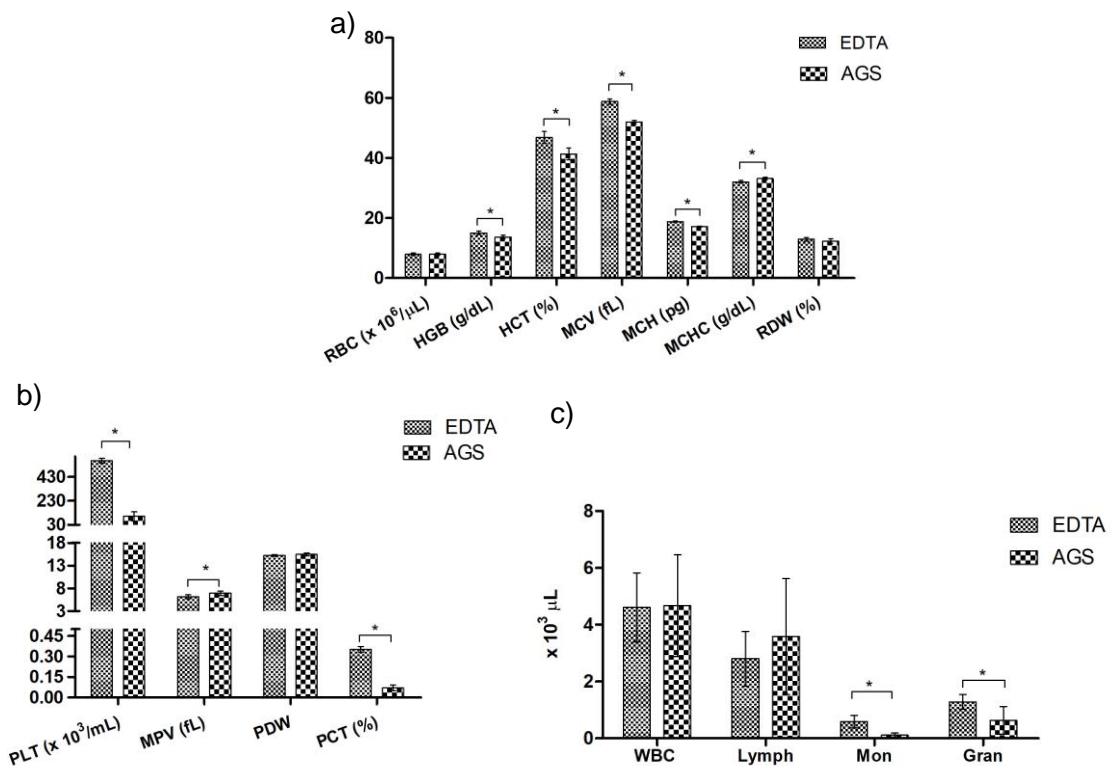


FIGURA 11 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS HEMATOLÓGICOS DAS AMOSTRAS DE SANGUE COLETADAS COM EDTA E COM AGS.

NOTAS: a) Série eritrocitária: quantidade de eritrócitos (RBC) em $\times 10^6/\mu\text{L}$, quantidade de hemoglobina (HGB) em g/dL, hematócrito (HCT) em porcentagem, volume corpuscular médio (MCV) em fL, hemoglobina corpuscular média (MCH) em pg, concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) em g/dL, amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) em porcentagem. b) Série plaquetária: quantidade de plaquetas (PLT) em $\times 10^3/\text{mL}$, volume plaquetário médio (MPV) em fL, amplitude de distribuição de plaquetas (PDW), plaquetócrito (PCT) em porcentagem. c) Série leucocitária: quantidade de leucócitos (WBC) em $\times 10^3/\mu\text{L}$, quantidade de linfócitos (Lymph) em $\times 10^3/\mu\text{L}$, quantidade de monócitos (Mon) em $\times 10^3/\mu\text{L}$, quantidade de granulócitos (Gran) em $\times 10^3/\mu\text{L}$. Os resultados foram expressos como a média \pm DP ($n=7$) e comparados pelo teste t, sendo considerados diferentes estatisticamente para valores de $*p<0,05$.

Quando comparados os resultados hematológicos das amostras de sangue coletadas dos mesmos animais com o controle (EDTA) e com AGS (Figura 11), nota-

se uma significativa diferença na determinação de alguns parâmetros das séries eritrocitária (Fig.11a) e leucocitária (Fig.11b), mas principalmente da série plaquetária (Fig.11c). Nesta última, a quantidade média de plaquetas (PLT) foi de $561 \times 10^3/\mu\text{L}$ nas amostras coletadas com EDTA e de $101 \times 10^3/\mu\text{L}$ nas amostras coletadas com AGS. Essa diminuição considerável do número de plaquetas nas amostras em presença de AGS também foi percebida na determinação do plaquetócrito (PCT), que corresponde ao volume total de plaquetas num determinado volume de sangue. Nas amostras coletadas com EDTA, o plaquetócrito médio foi de 0,355%, enquanto que nas amostras coletadas com AGS foi de 0,069%. Estes resultados indicam que AGS parece induzir uma agregação plaquetária, interferindo na análise deste parâmetro hematológico. Em, praticamente, todos os resultados que apresentaram diferença significativa, os grupos obtidos com AGS obtiveram resultados inferiores aos com EDTA, com exceção do MPV, que foi superior ao do grupo controle.

Analisando os resultados desta pesquisa com os de outros estudos (LIMA *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2012; SAOUDI *et al.*, 2011) foi possível perceber que há uma variação dos resultados dos exames bioquímicos e hematológicos mesmo quando o sangue dos animais é coletado na presença do mesmo anticoagulante (Tabelas 4 e 5).

TABELA 4 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE EXAMES BIOQUÍMICOS DE RATOS WISTAR OBTIDOS NESTA PESQUISA, UTILIZANDO EDTA E AGS COMO ANTICOAGULANTES, COM AQUELES OBTIDOS EM OUTROS ESTUDOS.

Parâmetros (Unid.)	EDTA (n=7)	AGS (n=7)	Ref. 1 – EDTA (n=32)	Ref.2 – EDTA (n=23)	Ref.3 - Heparina (n=6)
ALT/TGP (U/L)	44,20±7	50,63±8,8	57,77±11,95	48,4±6,46	53,1±3,5
AST/TGO (U/L)	144,5±35,21	257,2±29,67	131,33±43,98	131,7±23,09	133,4±6
Proteína Total (g/dL)	5,69±0,39	6±0,22	5,75±0,87	6,2±0,26	7,54±0,17
Albumina (g/dL)	2,80±0,1	2,84±0,13	2,65±0,3	3,0±0,12	4,11±0,1
Globulina (g/dL)	2,89±0,37	3,16±0,16	3,5±1,15	3,1±0,2	-
Creatinina (mg/dL)	0,41±0,15	0,57±0,07	0,58±0,24	0,5±0,05	-
Ureia (mg/dL)	46,03±6,84	45,03±6,48	39,97±6,78	35,9±3,58	-
Triglicérides (mg/dL)	51,76±14,58	55,53±13,5	46,87±18,73	89,9±29,16	122,93±4,2
Colesterol (mg/dL)	61,89±5,2	66,67±5,56	60,68±6,51	67,4±8,72	80,06±4,23
BILT (md/dL)	0,17±0,02	0,18±0,02	0,08±0,04	0,07±0,02	0,2±0,06

BILD (mg/dL)	0,013±0,01	0,02±0,017	0,03±0,02	0,03±0,02	-
BILI (md/dL)	0,15±0,02	0,16±0,020	0,06±0,05	0,01±0,0	-

NOTAS: BILT: bilirrubina total; BILD: bilirrubina direta; BILI: bilirrubina indireta. Ref.1: Lima *et al.*, 2014 (machos coletados com EDTA). Ref.2: Melo *et al.*, 2012 (machos coletados com EDTA). Ref.3: Saoudi *et al.*, 2011 (machos coletados com heparina). Os resultados representam a média ±DP.

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE EXAMES HEMATOLÓGICOS DE RATOS WISTAR OBTIDOS NESTA PESQUISA, UTILIZANDO EDTA E AGS COMO ANTICOAGULANTES, COM AQUELES OBTIDOS EM OUTROS ESTUDOS.

Parâmetros (Unid.)	EDTA	AGS	Ref. 1 – EDTA (n=32)	Ref.2 – EDTA (n=23)	Ref.3 - Heparina (n=6)
Hemácias (x10⁶/uL)	7,99±0,36	7,96±0,38	8,65±1,11	8±0,55	7,39±0,36
Hemoglobina (g/dL)	15,06±0,62	13,73±0,56	15±1,45	14,5±0,78	14,37±0,44
Hematócrito (%)	46,90±1,9	41,40±1,9	43,30±3,51	44,2±2,95	42,15±1,53
MCV (fL)	58,81±0,84	52±0,55	47,75±2,89	55,5±2,22	57,23±2,23
MCH (pg)	18,83±0,26	17,19±0,16	16,51±0,3	18,2±0,57	20,11±0,86
CHCM (g/dL)	32,06±0,5	33,17±0,39	34,89±2,41	32,8±1,09	35,11±1,55
RDW (%)	12,97±0,61	12,33±0,79	-	15,90±1,72	-
MPV (fL)	6,19±0,44	6,96±0,49	-	7,52±0,35	-
Plaquetas (x10⁵/uL)	5,61±0,21	1,01±0,38	9,82±1,67	10,95±1,52	7,03±0,65
Leucócitos (x10³/uL)	4,61±1,21	4,67±1,79	7,63±2,37	9,7±2,21	10,55±0,34
Linfócitos (%)	59,73±8,12	73,37±31,57	67,36±15,31	70±7,37	-
Monócitos (%)	13,21±3,32	2,77±1,93	5,27±3,52	3,9±1,31	-
Granulócitos (%)	27,06±5,32	12,45±4,51	35,33±16,82	26,1±8,67	-

NOTAS: MCV: volume corpuscular médio, MCH: hemoglobina corpuscular média, MCHC: concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW: amplitude de distribuição de eritrócitos, MPV: volume plaquetário médio. Ref.1: Lima *et al.*, 2014 (machos coletados com EDTA). Ref.2: Melo *et al.*, 2012 (machos coletados com EDTA). Ref.3: Saoudi *et al.*, 2011 (machos coletados com heparina). Os resultados representam a média ±DP.

Diante disso, se forem levados em consideração os dados disponíveis na literatura, os resultados obtidos com a fração AGS estariam, para grande parte dos parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados, em faixas talvez aceitáveis de variação. Isso significa que, para alguns dos parâmetros analisados, as médias dos

resultados obtidos na presença de AGS estão dentro dos intervalos de desvio padrão obtidos em outros estudos. Os valores apresentados pela Ref. 1 (LIMA *et al.*, 2014), foram os mais próximos dos resultados desta pesquisa. A média dos valores do grupo coletado com AGS está dentro do intervalo de desvio padrão em 61% dos exames realizados pela Ref.1 e a média dos valores do grupo coletado com EDTA está dentro do intervalo de desvio padrão em 65% dos exames realizados pela Ref.1. Portanto, mesmo o grupo coletado com EDTA, o mesmo anticoagulante usado na Ref.1, apresentou divergência dos valores obtidos em 35% dos parâmetros analisados.

Apesar de esta visão aparentar uma possibilidade do uso de AGS para realização de análises clínicas, AGS conferiu diferenças nos resultados de alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos observados de modo significativo. Além disso, a indicação de hemólise no sangue coletado com AGS aponta para uma dificuldade em relação a sua utilização para as análises laboratoriais bioquímicas e hematológicas. Portanto, pelo menos nas condições aqui testadas, AGS não seria um anticoagulante adequado para utilização em laboratório de análises clínicas. Contudo, talvez seja relevante uma investigação da ação que AGS poderia ter sobre a agregação plaquetária.

6 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados, pode-se concluir que a extração da farinha de soja foi efetiva, gerando a fração AG que corresponde com uma arabinogalactana. Além do mais, a sulfatação química de AG gerou a fração AGS com DS de 0,39. Na análise estrutural, o perfil de eluição de AG e AGS se apresentaram heterogêneos com presença de dois picos principais. Os espectros de RMN (HSQC-DEPT) dos polissacarídeos AG e AGS foram muito similares, provavelmente devido ao moderado DS da fração sulfatada. Em relação à composição monossacarídica de AG e AGS, estas indicaram presença em maiores proporções de galactose, arabinose, ramnose e ácido urônico, sendo que por meio da CCD, notou-se presença de ácido galacturônico em ambas as frações.

Na avaliação da atividade anticoagulante *in vitro* por aPTT, AGS mostrou efeito anticoagulante, aumentando o tempo de aPTT em 6,89 vezes na concentração de 50 µg/mL quando comparado ao controle negativo (salina).

Na avaliação da possibilidade da utilização de AGS para coleta de sangue em análises clínicas, AGS conferiu alterações dos resultados quando comparados com o grupo coletado com EDTA em alguns parâmetros. Nos exames bioquímicos, os resultados dos testes realizados por meio da coleta com AGS apresentaram diferenças significativas apenas no nível de AST e creatinina, além de impossibilitar a dosagem de GGT devido a hemólise. Para os parâmetros hematológicos, os resultados dos testes realizados por meio da coleta com AGS apresentaram diferenças significativas na maioria dos testes, principalmente, na série plaquetária, onde os níveis apresentaram diferenças expressivas. Para alguns dos parâmetros analisados, as médias dos resultados obtidos na presença de AGS estão dentro dos intervalos de desvio padrão obtidos em outros estudos presentes na literatura. Porém, apesar desta observação e dos resultados dos exames bioquímicos dos tubos contendo AGS se assemelharem, na maior parte dos parâmetros, com o dos tubos contendo EDTA, AGS provocou diferenças estatisticamente significativas nos valores de AST e creatinina além do fato de AGS ter causado hemólise, o que demonstra que este anticoagulante apresenta limitações para sua utilização. Ainda mais, para as análises hematológicas, AGS apresentou resultados com diferença significativa na maior parte dos parâmetros. Diante disso, nas condições deste estudo AGS não se

apresentou como um anticoagulante versátil e adequado para análises bioquímicas e hematológicas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. L. C.; BIRD, R. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology**, v.14, p. 462-470, 2009.
- ALBAN, S.; SCHAUERTE, A.; FRANZ, G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. **Carbohydrates Polymers**, v. 47, p. 267-276, 2002.
- ALBUQUERQUE, D. C.; ALBUQUERQUE, F. N. Utilização das heparinas nas síndromes isquêmicas agudas. Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro. v.14, p. 28-33, 2001.
- ALVES, G. M. Efeitos dos anticoagulantes – citrato de sódio, EDTA-K3 e heparina sódica nas análises hematimétricas e bioquímicas em Araras Canindé (*Ara ararauna*), Tigre d'água (*Trachemyscripta*) e Pacamãs (*Lophosilurus alexandri*). Dissertação. UFMG. 2013.
- AUSTIN, K. S. Haemostasis. **Medicine**, v. 45, n. 4, p. 204-208, 2017.
- BARROWCLIFE, T. W.; MULLOY, B.; JOHNSON, E. A.; THOMAS, D. P. The anticoagulant activity of heparin: measurement and relationship to chemical structure. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 7, n. 2, p. 217-226, 1989.
- BASTOS, M. S; BERNER, A. A.; RAMOS, E. R. P. Avaliação do grau de hemólise e sua interferência em análises bioquímicas de amostras obtidas por diferentes técnicas de coleta de sangue venoso. Anais Eletrônico – V Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica - Centro Universitário de Maringa. 2010.
- BATTY, P.; SMITH, J. G. Haemostasis. **Surgery**. 28, n. 11. p. 530-535, 2010.
- BERGER, M.; SILVA, W. O. B.; SANTI, L.; GUIMARÃES, J. A. Hemostasia: uma breve revisão. **Caderno Pedagógico**, v. 11, n. 1, p. 140-148, 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1975.
- CAPOOR, M. N. *et al.* Prothrombin time and activates partial thromboplastin time testing: a comparative effectiveness study in a million-patient sample. **PlosOne**. v. 10, n. 8, p. 1-13, 2015.
- CARLOS, M. M. L.; FREITAS, P. D. F. S. Estudo da cascata de coagulação sanguínea e seus valores de referência. **Acta Veterinária Brasília**. v. 1, n. 2, p. 49-55, 2007.
- CASU, B. Structure and Active Domains of Heparin. **Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate**. Chapter 1, p.1-28. 2005.
- CEDRONE, E. *et al.* Anticoagulants Influence the Performance of In Vitro Assays Intended for Characterization of Nanotechnology-Based Formulations. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 1-17, 2018.
- CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.

- CHANDARAJOTI, K; LIU, J.; PAWLINSKI, R. The design and synthesis of new synthetic low molecular weight heparins. **Journal of Thromboembolism and Haematology**, v. 14, n. 6, p. 1135-1145, 2016.
- CIPRIANI, T.R.; MELLINGER, C.G.; BERTOLINI, M.L.C.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MARQUES, M.C.A.; GORIN, P.A.J.; SASSAKI, G.L.; IACOMINI, M. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chemistry**, v.115, p. 687-690, 2009.
- CURNOW, J.; PASALIC, L.; FAVALORO, E. J. Why do patients bleed? **Journal of Surgery**. v. 2, p. 29-43, 2016.
- CLÉ, D. V.; GARCIA, A. A.; BRUNETTA, D. M.; SCHWARTZMANN, P.; MORIGUTI, J. G. Anticoagulação em pacientes hospitalizados. Simpósio: Condutas em enfermagem de clínica média de hospital de média complexidade- parte 1 Capítulo II. **Medicina (Ribeirão Preto)**. P. 107-117. 2010.
- COELHO, T. C. Síntese e caracterização de heparina de baixa massa molar. Grupo de pesquisa em quitinas e aplicações tecnológicas (QHTECH). Universidade Federal de Santa Catarina. 2004.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulfate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, n. 1, p 106-110, 1962.
- FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. O.; DUSSE, L. M. S. A. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia**, v. 35, n. 5, p. 416- 421, 2010.
- FERNANDES, A. T.; GIROLDO, H. G.; OLIVERIA, C. A. Estudos dos genes do fator V de Leiden e da protrombina em acadêmicos do interior de São Paulo: um perfil polimórfico. **Revista Científica da FHO Uniararas**, v. 5, n.1, p. 24-29, 2017.
- FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C; CARPITA, N. C. Measurement of Uronic Acids without Interference from Neutral Sugars. **Analytical Biochemistry**, v.197, n. 1, p. 157-162, 1991.
- FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P. M. Past, present and future of hemophilia: a narrative review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, p. 7-24. 2012.
- FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina, Ribeirão Preto**. v.34, p. 229-237, 2001.
- JIA, X; CHEN, M.; WAN, J.B.; SU, H.; HE, C. Review on the extraction, characterization and application of soybean polysaccharide. **The Royal Society of Chemistry**.v.5, p. 73525-73534, 2015.
- JOHNSON, L. A.; WHITE, P. J.; GALLOWAY, R. Soybeans: Chemistry, Production, Processing and Utilization. **AOCS Press**. p. 274. 2008.
- LARM, O.; LARSSON, K.; SCHOLANDER, E.The preparation of a heparin analogue from alginic acid. **Carbohydrate Research**, v. 73, p. 332-336, 1979.
- LEUNG, L. L. K. Distúrbios da coagulação. **Medicina Net**, p. 1-13, 2014.
- LIMA, C. M.; LIMA, A. K.; MELO, M. G. D.; DORIA, G. A. A.; LEITE, B. L. S. *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, p. 1-9, 2014.

- LIPPI, G.; SALVAGNO, G. L.; MONTAGNANA, M.; BROCCO, G.; GUIDI, G. C. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 44, n. 3, p. 311-316, 2006.
- MACKMAN, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature**. v. 451, p. 914-918, 2008.
- MARTINICHEN, J. C. Propriedades anticoagulantes e antitrombóticas de polissacarídeos quimicamente sulfatados de líquens. Tese de Doutorado para Pós-Graduação de Bioquímica da UFPR. 2005.
- MELO, M. G. D.; DORIA, G. A. A.; ARAUJO, A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, p.1-6, 2012.
- MESTECHKINA, N. M.; SCHERBUKHIN, V. D.; BANNIKOVA, G. E.; VARLAMOV, V. P.; DROZD, N. N. et al. Anticoagulant activity of low-molecular-weight sulfated derivatives of galactomannan from *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) seeds. **Pleiades Publishing**, v. 44, n. 1, p. 98-103, 2008.
- MESTECHKINA, N. M.; SCHERBUKHIN, V. D. Sulfated Polysaccharides and Their Anticoagulant Activity: A Review. **Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 267-273, 2010.
- MONROE, D.M.; HOFFMAN, M. What does it take to make the perfect clot? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.26, p.41-48. 2006.
- MOHRI, M.; SHAKERI, H.; ZADEH, S. L. Effects of common anticoagulants (heparin, citrate and EDTA) on routine plasma biochemistry of cattle. **Comparative Clinical Pathology**, v.16, p. 207-209, 2007
- NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **Biochemical Journal**, v. 86, p. 1323-1329, 1979.
- NORRIS, L. A. Blood coagulation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 17, n. 3, p 369-383. 2003.
- OBERHUBER, V.K.; FILIPOVIC, M. New antiplatelet drugs and new oral anticoagulants. **British Journal of Anaesthesia**, 117(S2): ii74-ii84. 2016.
- OCHOA, Y. R. Atividades anticoagulante e antitrombótica de polissacarídeos sulfatados e fosforilados. Tese. UFPR. 2017.
- ODUAH, E. I.; LINHARDT, R. J.; SHARFSTEIN, S. T. Heparin: past, present, and future. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 38, p. 1-12. 2016.
- POMIN, V. H. An overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. **Biopolymers**, v. 91, n. 8, p. 601-609. 2009.
- PREVITALI, E.; BUCCIARELLI, P.; PASSAMONTI, S. M.; MARTINELLO, I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. **Blood Transfus**, v. 9, p. 120-138, 2011.
- RIGO, A. A. Obtenção e caracterização de farinhas de soja das cultivares BRS 267, BRS 257 e VMAX. URI- Erechim. Departamento de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Erechim, RS, 2015.

- ROMÁN, Y.; IACOMINI, M., SASSAKI, G. L., CIPRIANI, T. R. Optimization of chemical sulfation, structural characterization and anticoagulant activity of *Agaricus bisporus* fucogalactan. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 345-352, 2016.
- RUTTMANN, T. Coagulation for the clinician. **South African Journal of Surgery**, v. 44, n. 1, p. 22-37, 2006.
- SANTANA, A. G. Identificação de possíveis alvos dos polissacarídeos sulfatados sobre a cascata de coagulação e análises *in silico* das interações. Monografia.UFPR. 2014
- SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.
- TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383-1388, 1972.
- VERSTEEG, H.H.; HEEMSKERK, J. W. M.; LEVI, M.; RETISMA, P. H. New Fundamentals in hemostasia. **Physiological Reviews**, v.1, n. 93, p. 327-358, 2013.
- WHISTLER, R. L.; SPENCER, W. W. Sulfation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 4, p. 297-298, 1964
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963 (a).
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-67, 1963 (b).
- YOSHIDA, R. A.; YOSHIDA, W. B.; ROLLO, H. A. Novos anticoagulantes para profilaxia de tromboembolismo venoso em cirurgias ortopédicas de grande porte. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 2, 2011.