



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Angélica Lorenzetti

**Estudo de via alternativa para a obtenção de heparina utilizando tecnologia enzimática e processos de separação por membranas**

Florianópolis

2022



Angélica Lorenzetti

**Estudo de via alternativa para a obtenção de heparina utilizando tecnologia  
enzimática e processos de separação por membranas**

Tese submetida ao Programa de pós-graduação  
em Engenharia de Alimentos da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a obtenção do  
título de doutor em Engenharia de Alimentos  
Orientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira  
Coorientadores: Prof. Dr. Marco Di Luccio  
Dr. Guilherme Zin

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lorenzetti, Angelica

Estudo de via alternativa para a obtenção de heparina utilizando tecnologia enzimática e processos de separação por membranas / Angelica Lorenzetti ; orientador, José Vladimir de Oliveira, coorientador, Marco di Luccio, coorientador, Guilherme Zin, 2022.

82 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. hidrólise enzimática. 3. heparina. 4. membranas. I. de Oliveira, José Vladimir . II. di Luccio, Marco. III. Zin, Guilherme IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos. V. Título.

Angélica Lorenzetti

Estudo de via alternativa para a obtenção de heparina utilizando tecnologia enzimática e processos de separação por membranas

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Rogério Marcos Dallago Dr.  
URI-ERECHIM

Prof.(a) Débora de Oliveira Dr.(a)  
UFSC

Prof. Alan Ambrosi Dr.  
UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Engenharia de Alimentos

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. José Vladimir de Oliveira Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado à minha resiliência e a todos  
que me sustentaram no caminho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar meu caminho mesmo quando eu não queria ouvir.

Aos meus pais, Valdir e Tercilia, meus irmãos Gelson, Geovane e Eliane. Vocês sempre foram meu alicerce, independente das minhas escolhas, não mediram esforços para me apoiar e incentivar, vibraram com minhas alegrias e me acolheram com muito carinho nos momentos de dificuldade e incerteza. Vocês foram essenciais para conclusão desse trabalho. Amo vocês!

Ao meu noivo Gustavo, meu parceiro que está sempre comigo não importa a distância ou os desafios. Te amo!

Aos meus orientadores, Vladimir, Marco e Guilherme, pelo apoio, incentivo, orientação, contribuições e confiança para realização desse trabalho.

Ao grupo LABSEM, pela amizade, ajuda, convivência divertida e por compartilhar bons momentos. Em especial, à Fabiana, Ingrid, Jéssica, Mariane, Monique e Nely pela companhia nas longas horas de trabalho, disponibilidade, apoio e ajuda na realização dos experimentos.

Ao programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos e à Universidade Federal de Santa Catarina.

À CAPES. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

À Prof<sup>a</sup>. Daniele Cristina da Silva Kazama e ao Laboratório de Forragicultura – CCA pela análise NIR.

À professora Juliana Bell por me receber na UCDAVIS e me ensinar tanto sobre persistência na pesquisa e na vida, você é uma profissional inspiradora. E a Fernanda, que me amparou tantas vezes no laboratório e me ensinou a confiar e defender minhas ideias.

Aos colegas da pós-graduação pela ajuda, troca de ideias, conversas e amizade.

Aos amigos, que distância alguma importa, obrigada por estarem comigo.

A todos aqueles que torceram, auxiliaram, confiaram e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“Há uma forma de fazer isso melhor – encontre-a.”*

(Thomas Edison)



## RESUMO

A produção de heparina é de grande importância para a sociedade, principalmente devido à sua aplicação como anticoagulante. No entanto, o processo de produção pouco mudou ao longo dos anos. Tradicionalmente a heparina vem sendo obtida, em escala industrial, empregando técnicas de hidrólise alcalina e resinas de troca iônica, intercalando processos de liberação desse composto para o meio e purificação, com dessulfatação e precipitação de proteínas. Durante esses processos, diversos compostos químicos são adicionados, o que aumenta o risco de contaminação do produto e dificulta as etapas de purificação. Hoje há uma série de novas tecnologias disponíveis que poderiam ser empregadas em sua melhoria. Nesse sentido, estudou-se um método de produção de heparina tendo como base a hidrólise enzimática de mucosa suína e os processos de separação com membranas, uma vez que essas tecnologias têm ganhado espaço devido ao baixo impacto ambiental e a alta seletividade. Após testes de hidrólise, as condições de processamento enzimático foram definidas em pH inicial 9, temperatura de 50 °C, 20% m/m de água adicionada à mucosa, agitação de 200 rpm e enzima Savinase® 16L 0,8% m/m. O material hidrolisado foi ultrafiltrado com membrana de 5 kDa e coletado o retido e o permeado. Para efeito de comparação com processos comuns na indústria, uma amostra foi produzida por hidrólise alcalina e recuperação por resina Purolite A860S. As amostras obtidas foram analisadas por NIR, ensaios fluorimétricos em kits de detecção de heparina e fator Xa e FTIR. Os resultados mostraram que a heparina estava presente em todas as amostras, mas com diferenças entre a fração do retido e do filtrado, de 0,76 U/g e 0,11 U/g, respectivamente, indicando uma possível variação da massa molar das moléculas de heparina presentes em cada uma dessas frações, resultante do processo enzimático e da permeação pelas membranas. A atividade anticoagulante da heparina foi detectada pelo ensaio fluorimétrico de Factor Xa em ambas as frações da permeação, embora em concentrações de 140 ug/L no filtrado e 34 ug/L no retido.

**Palavras-chave:** Savinase®, enzimas proteolíticas, *Porcin Heparin ELISA*, *Factor Xa Activity Fluorometric Assay*

## ABSTRACT

Heparin's production has great importance to society, mainly due to its applicability as an anticoagulant. However, the production process has changed little over the years. Traditionally, heparin has been obtained, on an industrial scale, using alkaline hydrolysis techniques and ion exchange resins, interspersing processes of releasing this compound into the medium and purification, with desulfation and protein precipitation. During these processes, several chemical compounds are added, which increases the risk of contamination of the product and complicates the purification steps. Today there are a few new technologies available that can be used to improve the process. In this sense, this study investigated a method of producing low molar mass heparin, based on enzymatic hydrolysis and ultrafiltration, since these technologies have gained space due to low environmental impact and high selectivity. After hydrolysis tests, the conditions of enzymatic hydrolysis were pH 9, 50 °C, 20% w / w of water applied to the mucosa, at 200 rpm stirring rate, and 0,8% w/w Savinase® 16L. The hydrolyzed material was filtered through a 5 kDa ultrafiltration membrane. For comparison with common industry processes, a sample was produced by alkaline hydrolysis and Purolite A860S recovery. Samples were characterized using FTIR, NIR, and fluorometric assays. The results show that the heparin is present in all the samples, but at different concentrations in the retentate and permeate of 0,76 U/g and 0,11 U/g, respectively. The presence of heparin was observed in all samples in different ranges, which indicates the delivery by the hydrolytic process and the separation of molar masses by the membranes. Heparin activity was detected with the Factor Xa assay in both membrane retentate and permeate fractions, although at concentrations of 140 ug/L in the permeate and 34 ug/L in the retentate.

**Keywords:** Savinase®, proteolytic enzymes, *Porcin Heparin ELISA*, *Factor Xa Activity Fluorometric Assay*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da heparina. ....	21
Figura 2: Diagrama do processo de produção .....	26
Figura 3: Características estruturais das HBPM's.....	28
Figura 4: Esquema de mecanismo de troca iônica. ....	32
Figura 5: Modos de operação em processos de separação com membranas: convencional (a) e tangencial (b).....	35
Figura 6: Variações de aplicabilidade em diferentes processos de separação com base em tamanhos de poros. ....	36
Figura 7: Mucosa suína homogeneizada. ....	39
Figura 9: Fluxograma do processo de obtenção das amostras estudadas.....	40
Figura 10: Sistema de permeação <i>dead-end</i> utilizado para a ultrafiltração por membrana (a) e peças do sistema de permeação (b). ....	44
Figura 11: Esquema de sistema de permeação com membranas.....	45
Figura 12: Fluxograma de utilização do kit <i>Porcine Heparin ELISA</i> . ....	49
Figura 13: Fluxograma de utilização do <i>Factor Xa Activity Fluorometric Assay Kit</i> ....	50
Figura 14: Evolução do GH da Savinase 16L durante as 6 h do processo.....	55
Figura 15: Gráfico de Pareto indicando os efeitos do GH durante a hidrólise de mucosa suína utilizando as enzimas Savinase 16L (a esquerda) e 12T (a direita) ( $p= 0,05$ ) referente ao planejamento experimental da Tabela 5. ....	55
Figura 16: Gráfico de Pareto indicando os efeitos do GH avaliados durante a hidrólise de mucosa suína utilizando a Alcalase 2.5L (a esquerda) e 3.0T (a direita) ( $p= 0,05$ ) referente ao planejamento experimental da Tabela 5. ....	56
Figura 17: Gráfico de Pareto indicando os efeitos significativos dos parâmetros avaliados durante a hidrólise de mucosa suína utilizando a Savinase 16L (a esquerda) e 12T (a direita) ( $p= 0,05$ ) referente ao planejamento experimental da Tabela 7.....	58
Figura 18: Gráfico de Pareto indicando os efeitos significativos dos parâmetros avaliados durante a hidrólise de mucosa suína utilizando a Alcalase 2.5L (a esquerda) e 3.0T (a direita) ( $p= 0,05$ ) referente ao planejamento experimental da Tabela 7.....	58
Figura 19: Comparativo entre as 3 formas de ajuste de pH testadas: sem controle de pH ( $pH_0=10$ ), com adição de solução tampão e com adição continuada de solução de NaOH 0,1M. Sendo os experimentos 5, 6 e 7 os pontos centrais. ....	59
Figura 20: Evolução do GH das enzimas estudadas ao longo de 96h de hidrólise. ....	60

Figura 21: Fotografia dos caldos hidrolisados por 12h, seguido de centrifugação. ....	61
Figura 22: Fotografia dos caldos hidrolisados por 12h, seguido de centrifugação. ....	62
Figura 23: Espectros NIR comparando a heparina médica com a amostra hidrolisada por 96h da Savinase 16L 0,1%, 50°C, pH 9 e da Savinase 12T 0,1%, 50°C, pH 9. ....	63
Figura 24: Espectros NIR comparando a heparina médica com a amostra hidrolisada por 96h da Alcalase 3.0T a 0,1%, 50°C, pH 9 e da Alcalase 2.5L 0,1%, 50°C, pH 9. ....	63
Figura 25: Fluxo de água da membrana UH004, com pressão de 3bar e temperatura ambiente de 21°C. Valores obtidos em triplicata.....	65
Figura 26: Fluxo de permeado do caldo hidrolisado. ....	66
Figura 27: Curva padrão para a análise de ATR-FTIR. ....	68
Figura 28: Espectros ATR-FTIR das amostras estudadas, cuja características são descritas pelo item 3.8. ....	69
Figura 29: Curva padrão de concentrações para o KIT <i>Heparin porcine</i> , ....	70
Figura 30: Curva padrão para o KIT <i>Factor XA Activity Fluorometric Assay</i> .....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Algumas das HBPMs disponíveis mundialmente .....	29
Tabela 2: Níveis do planejamento fatorial aplicado para determinação das concentrações de enzima e substrato do processo de hidrólise para cada enzima. ....	42
Tabela 3: Níveis do planejamento fatorial aplicado para determinação do pH e temperatura do processo de hidrólise. ....	42
Tabela 4: Composição geral da mucosa suína.....	52
Tabela 5: Atividade enzimática das enzimas estudadas. ....	53
Tabela 6: GHs obtidos em duplicata, após 6 h de hidrólise, com concentração de 0,8% de enzima, 50 °C, 20% de água e pH 10. ....	53
Tabela 7: Grau de hidrólise obtido para diferentes tipos de enzimas e valores de temperatura e pH. ....	54
Tabela 8: Valores de GH obtidos na execução do planejamento experimental da Tabela 7 para cada enzima estudada no tempo de 6h de hidrólise.....	57
Tabela 9: Concentrações e áreas de pico obtidas para a elaboração da curva de calibração de ATR-FTIR. ....	67
Tabela 11: Áreas obtidas nos pontos de interesse através de integração pelo software IRsolution e cálculo de estimativa de concentração de heparina das amostras estudadas. ....	70
Tabela 12: Concentrações de heparina obtidas através de análise com o KIT <i>Porcine Heparin ELISA</i> . ....	71
Tabela 13: Valores no tempo inicial (RFU (0min)) e final (RFU (60min)) e o $\Delta$ RFU em cada concentração conhecida utilizados para a elaboração da curva padrão. ....	72
Tabela 14: Valores de fluorescência e resultados do KIT. ....	73

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1	OBJETIVOS GERAL.....	20
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>21</b>
2.1	HEPARINA: CARACTERÍSTICAS GERAIS .....	21
<b>2.1.1</b>	<b>Mecanismos de interação da heparina.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Produção industrial .....</b>	<b>25</b>
2.2	HEPARINA DE BAIXA MASSA MOLAR.....	27
2.3	PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO POR TROCA IÔNICA .....	31
2.4	PROCESSOS DE FRACIONAMENTO POR DIFERENÇA DE MASSA MOLAR .....	34
2.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	36
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
3.1	MATERIAL.....	38
3.2	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HEPARINA POR HIDROLISE ENZIMÁTICA .....	39
<b>3.2.1</b>	<b>Aparato experimental para a realização dos ensaios de hidrólise enzimática.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Definição das condições de processo .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Purificação por membrana .....</b>	<b>43</b>
3.3	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HEPARINA COM A RESINA A860S – PROCESSO UTILIZADO COM MAIS FREQUENCIA NA INDÚSTRIA.....	45
3.4	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS E CARACTERIZAÇÃO.....	46
<b>3.4.1</b>	<b>Caracterização química da mucosa suína .....</b>	<b>46</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Determinação do grau de hidrólise (GH) - Método de Sorensen .....</b>	<b>47</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Atividade enzimática das proteases .....</b>	<b>47</b>

		15
3.5	CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO OBTIDO .....	48
3.5.1	<b>Ensaio para a detecção de heparina .....</b>	<b>48</b>
3.5.2	<b>Análise de heparina por espectrometria de infravermelho próximo - NIR .....</b>	<b>50</b>
3.5.3	<b>Análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....</b>	<b>50</b>
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	51
4	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA MUCOSA SUÍNA .....	52
4.2	ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	52
4.3	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	53
4.4	ANÁLISE DO PRODUTO DE HIDRÓLISE POR ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO - NIR .....	61
4.5	FRACIONAMENTO DO CALDO OBTIDO POR PERMEAÇÃO POR MEMBRANA.....	64
4.6	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (ATR-FTIR).....	66
4.7	ANÁLISE POR KIT <i>Porcine Heparin ELISA</i> .....	70
4.8	ANÁLISE POR KIT <i>Factor XA Activity Fluorometric Assay</i> .....	72
5	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
6	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>

## Diagrama conceitual do trabalho

Estudo de via alternativa para a obtenção de heparina utilizando tecnologia enzimática e processos de separação por membranas

### **Por quê?**

- Demanda crescente de heparina
- Processo atual de produção utiliza compostos que podem prejudicar a pureza do produto
- Busca pela redução de custos operacionais
- Aplicação de processos menos danosos ao meio ambiente

### **Quem já fez?**

- A produção de heparina não é foco de pesquisa na literatura. Hoje se estuda mais sua aplicação. Por isso a necessidade da melhoria do processo de obtenção desta substância por meio de tecnologias modernas e mais alinhadas com as demandas atuais. Alguns estudos trazem a aplicação de novas enzimas e resinas para purificação, entretanto pouco se fala sobre mudanças no processo de produção.

### **Hipóteses**

- É possível liberar a heparina da mucosa apenas com a hidrólise enzimática das proteínas.
- É possível empregar membranas para a separação da heparina do caldo hidrolisado.
- Aplicando membranas é possível fracionar ou purificar a heparina bruta.

### **Métodos experimentais**

- Planejamento experimental para determinação das melhores condições de hidrólise enzimática
- Análise do Grau de Hidrólise (GH) visando acompanhar a evolução da hidrólise enzimática
- Aplicação de resina e membranas para a purificação da heparina e aplicação de membrana de ultrafiltração para o fracionamento da heparina
- Caracterização físico-química do caldo por meio do emprego de ensaios de detecção e quantificação de heparina e técnica FTIR e NIR

### **Respostas**

- Condições de hidrólise enzimática da mucosa intestinal suína: pH, temperatura, quantidade de enzima, concentração de substrato e etapas de separação para a produção do caldo hidrolisado para a etapa de fracionamento



- Método controle de separação da heparina do caldo hidrolisado – troca iônica por resina
- Heparina fracionada por ultrafiltração
- Produtos obtidos caracterizados por análises fluorométricas, NIR e FTIR

## 1 INTRODUÇÃO

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são a fração glicídica constituinte dos proteoglicanos, uma classe de biomoléculas de função estrutural, presentes fundamentalmente no tecido conjuntivo, epitelial e ósseo, assim como no ambiente intercelular (LINHARDT, 1991). Entre os GAGs comercialmente importantes, encontra-se a heparina.

A heparina é um polissacarídeo altamente sulfatado, consistindo em unidades alternadas de glicosamina e ácido urônico. Apresenta alta carga negativa, tem massa molar que varia entre 3 e 30 kDa e alta densidade. Essas características bastante particulares permitem sua extração mesmo quando presente em baixas concentrações no material de partida (~160-260 mg/kg) (MEER; KELLENBACH; BOS, 2017).

Teoricamente existem 32 dissacarídeos que compõem a heparina, tornando-a mais complexa do que outros biopolímeros, como proteínas e ácidos nucleicos. A atividade anticoagulante da heparina é o resultado de sua ação potencializadora na antitrombina (ATIII) que inibe a ação dos fatores de pró-coagulação IIa (isto é, trombina) e Xa por ligação covalente, resultando finalmente numa redução da coagulação (MULLOY; HOGWOOD; GRAY, 2010). Além de ser um ótimo anticoagulante, a heparina tem apresentado boas respostas no tratamento de diversas doenças inflamatórias relacionadas, como asma (TAHIR AHMED, 1993), fibrose cística (LEDSON *et al.*, 2001), colite ulcerativa (BERGAMASCHINI *et al.*, 2004) e Alzheimer (PA *et al.*, 2000).

Em seres humanos, o uso da heparina como anticoagulante iniciou-se no Canadá, em 1937. Nos anos seguintes, a heparina sofreu melhorias em seu processo de purificação (YATES; RUDD, 2016). A fonte de obtenção é de origem animal, isolada e extraída da mucosa intestinal de suínos e do tecido pulmonar bovino (FOSTER; HIJGGARD, 1953). No entanto, devido ao receio de transmissão de encefalopatia espongiforme bovina, doença que se espalhou em rebanhos na década de 1990, a maior parte da heparina mundial passou a ser retirada apenas de suínos, embora na América Latina ainda se utiliza heparina de origem bovina (YATES; RUDD, 2016).

Desde a sua descoberta, o processo de obtenção pouco mudou. O método tradicional de extração da heparina utiliza colunas com resinas para retenção e posterior eluição do material retido. Este procedimento somente é possível devido ao fato de a

heparina ser um polissacarídeo sulfatado, o qual possui unidades alternadas de glicosamina e ácido urônico, e apresenta alta densidade de cargas negativas (MEER; KELLENBACH; BOS, 2017).

Entretanto, o uso de resinas nesse tipo de processo conduz a baixos volumes de produção, pois é necessário elevado tempo de retenção na coluna, resultando em lento processo produtivo. É importante ressaltar que as dificuldades apresentadas na limpeza e reutilização das colunas de resina elevam os custos de operação e manutenção (Opex).

Considerando o exposto e o crescente aumento da demanda por heparina, processos alternativos para a sua obtenção e fracionamento tornam-se de grande interesse. A utilização de processos envolvendo membranas surge como uma abordagem interessante devido às características apresentadas por esta tecnologia, sejam elas membranas de fracionamento ou membranas trocadoras de íons.

De acordo com a literatura, as membranas de fracionamento são de fácil escalabilidade, baixo custo energético, de fácil operação e automação, apresenta alta eficiência na separação, alta qualidade do produto e flexibilidade aos processos, pois os processos com membranas podem ser combinados com outras operações (CHERYAN; RAJAGOPALAN, 1998; PADAKI *et al.*, 2015; REZZADORI *et al.*, 2017).

Por outro lado, as membranas trocadoras de íons precisam de atenção na otimização, já que a variação dos parâmetros normalmente tem efeitos opostos, é preciso conhecer as características intrínsecas dos materiais e dos métodos de preparação para garantir uma boa otimização. Novos materiais de IEM. Em contrapartida apresentam alta seletividade e permeabilidade iônica, alta resistência a variação de pHs, estabilidade a temperaturas de até 40 °C e alta resistência mecânica (MÜLLER *et al.*, 2012; RAN *et al.*, 2017).

As propriedades biológicas da heparina são analisadas por meio de diferentes técnicas, como por exemplo atividades antifator Xa e antifator IIa, técnicas de ressonância magnética nuclear (NMR), bombardeamento rápido de átomos (MS/MS-FAB), ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) ou técnicas de ionização por spray (ESI) para elucidação estrutural. A análise cromatográfica de heparina visa determinar a polidispersividade e a massa molar das amostras, podendo ser utilizadas as seguintes técnicas: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia de permeação em gel (GPC), cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) e eletroforese capilar (CE). As diferenças estruturais afetam as propriedades clínicas da heparina, constituindo-se

como uma das principais preocupações ao trabalhar com essas moléculas (LINHARDT & GUNAY, 1999).

A motivação deste trabalho está em estudar um método de obtenção e fracionamento de heparina alternativo ao método tradicional (resinas de troca iônica + técnicas cromatográficas para confirmação de massas molares). Este último foi usado como ensaio controle. A ultrafiltração também foi utilizada. Primeiramente, a liberação da heparina foi realizada por hidrólise enzimática, seguida então de fracionamento por membranas com massas molares de corte bem definidas (ultrafiltração), visando à obtenção de heparina de baixa massa molar (HBPM) que é mais eficiente porque permanece mais tempo ativa na circulação, podendo ser ministrada em doses menores, evitando hemorragias ou outros efeitos indesejados.

### 1.1 OBJETIVOS GERAL

Estudar um método que possibilite obter e fracionar a heparina diretamente da mucosa suína por meio do uso de hidrólise enzimática e processos de separação por membrana de ultrafiltração.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os seguintes objetivos específicos foram delineados:

1. avaliar e selecionar a enzima, estudando as condições de hidrólise enzimática da mucosa intestinal suína como pH, temperatura, concentração de enzima, concentração de substrato e etapas de separação;
2. reproduzir o método controle de separação da heparina do caldo hidrolisado – troca iônica por resina-fornecido pela empresa Purolite, para comparação com o método aqui estudado;
3. fracionar a heparina bruta por ultrafiltração;
4. caracterizar os produtos obtidos por meio de técnicas físico-químicas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

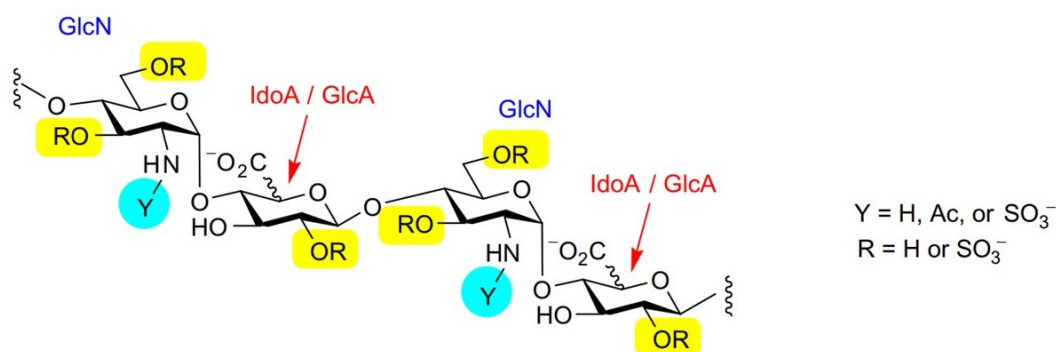
Esta seção apresenta os fundamentos sobre a heparina e foca em estudos encontrados na literatura sobre os mecanismos de interação química que esta possui e os processos de produção existentes, os quais foram usados para fundamentar e executar o presente trabalho.

### 2.1 HEPARINA: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Descoberta e isolada primeiramente a partir de cães, a heparina é atualmente extraída principalmente de suínos. É importante ressaltar que uma pequena fração ainda é obtida de bovinos. A heparina é um glicosaminoglicano, polissacarídeo linear produzido pelos mastócitos com propriedades anticoagulantes, anexado às proteínas centrais dos proteoglicanos, consistindo em unidades repetidas de ácido urônico e D-glicosamina (LINHARDT, 2003). A família GAG compreende heparina, sulfato de heparano (HS), sulfato de condroitina (CS), sulfato de dermatano (DS) e sulfato de queratano (KS).

A grande quantidade de grupos sulfo e carboxil torna a heparina o polieletrólito com a maior densidade de carga negativa entre as macromoléculas biológicas conhecidas. A heparina é polidispersa com uma faixa de massa molar de 3 a 30 kDa, massa molar média de 12 kDa e carga negativa média de aproximadamente  $-75$  C (LINHARDT, 2003). A Figura 1 mostra a estrutura da heparina.

Figura 1: Estrutura da heparina.



Adaptado de: Achour et al (ACHOUR *et al.*, 2012).

Os polissacarídeos apresentam diferentes massas molares, o que os tornam mais complexos do que muitas moléculas. Além de consistir em uma sequência repetida de dissacarídeos trissulfatados, a heparina contém outras estruturas de dissacarídeos, fato que caracteriza sua complexidade. A multiplicidade da estrutura da heparina aparece nas diferentes quantidades de cadeias GAG ligadas aos vários resíduos de serina da proteína principal. Como cada cadeia de heparina está ligada a uma única proteína do núcleo, a serglicina, a cada sequência de GAG's formada têm-se características diferentes de conformação de sacarídeo, flexibilidade da cadeia, massa molar e densidade de carga (LINHARDT, 2003).

A heparina é composta por unidades repetidas de dissacarídeos de D-glucosamina e ácido urônico ligados por 1,4 ligações interglicosídicas. Os principais grupos funcionais na unidade dissacarídea são  $\text{COO}^-$ ,  $\text{SO}_3^-$ , OH, NH e  $\text{C}^-\text{O}^-\text{C}$ . Os picos de interesse são característicos da molécula de heparina e cada um normalmente inclui uma série de ligações características, como descrito no Quadro 1.

Quadro 1: Atribuições de banda IR para heparina da literatura.

Banda do pico/região/cm <sup>-1</sup>	Estrutura/ banda correlacionada	Referência
1000-1200	Modos de alongamento C-O de carboidratos característicos e flexão C-O-H	ORR, S. F. D (1954).
1020-1120	S=O alongamento simétrico	TIPSON, R. S (1968); CABASSI, F., Casu, B. & Perlin, A. S (1978).
1180-1200	N-sulfatação	CABASSI, F., Casu, B. & Perlin, A. S (1978); GRANT, D., Long, W. F., Moffat, C. F. & Williamson, F. B. (1989);
1230	S=O	TIPSON, R. S (1968); GRANT, D., Long, W. F., Moffat, C. F. & Williamson, F. B.(1991); NEELY, B. W. (1957); MAINRECK, N. <i>et al</i> (2010); FOOT, M. & Mulholland, M. (2005); HAN, W., Li, Q., Lv, Y., Wang, Q. C. & Zhao, X. (2018)
1230-1235	N-sulfonato (obscurecido por alto OS)	GRANT, D., Long, W. F., Moffat, C. F. & Williamson, F. B.(1991); GRANT, D., Long, W. F., Moffat, C. F. & Williamson, F. B.(1989); GRANT, D., Long, W. F., Moffat, C. F. & Williamson, F. B.(1987).
1240	C=O alongamento de NAc e S=O alongamento assimétrico	NEELY, B. W.(1957). CABASSI, F., Casu, B. & Perlin, A. S (1978);
1210-1320	C-O ácido carboxílico	TIPSON, R. S (1968)
1250-1310	S=O	HARWS, M. J. & Turvey, (1970)
1417-33	Alongamento de carboxilato	TIPSON, R. S (1968); GRANT, D., Long, W. F., Moffat, C. F. & Williamson, F. B.(1991); GRANT, D., Long, W. F., Moffat, C. F. & Williamson, F. B.(1989).
1429-32	Interação carboxil- NS	TIPSON, R. S (1968)
1550-(1650)	NA deformação	ORR, S. F. D (1954); TIPSON, R. S (1968); NEELY, B. W. (1957); CABASSI, F., Casu, B. & Perlin, A. S (1978).
3100-3700	Banda OH	TIPSON, R. S (1968); NEELY, B. W. (1957); ORR, S. F. D (1954).
3500-3700	OH livre	TIPSON, R. S (1968); NEELY, B. W. (1957); ORR, S. F. D (1954).

### 2.1.1 Mecanismos de interação da heparina

A heparina tem grande capacidade de interação com inúmeras moléculas. No que tange a moléculas de proteína, tem-se a descrição de interações com mais de 200 proteínas de ligação e com 23% das proteínas plasmáticas (SAITO; MUNAKATA, 2007). As interações com proteínas têm sido bastante estudadas devido às suas funções fisiológicas no organismo humano e sua função como medicamento anticoagulante (HAO *et al.*, 2019).

Estudos analisaram quais as sequências de aminoácidos mais presentes nos sítios de ligação da heparina e mostraram que peptídeos, como arginina e lisina, e aminoácidos polares têm boa afinidade. O efeito do padrão e espaçamento dos aminoácidos básicos

nos locais de ligação à heparina mostrou que essa interagiu mais firmemente com peptídeos contendo um local de ligação complementar com alta densidade de carga positiva (CALDWELL *et al.*, 1996; FROMM *et al.*, 1995).

A heparina interage e regula as atividades de ampla gama de proteínas essenciais para processos fisiológicos e fisiopatológicos, como coagulação sanguínea, infecção por patógenos, diferenciação celular, crescimento celular e migração, inflamação, desenvolvimento e regeneração neural e hemostasia (HAO *et al.*, 2019). Essas interações são amplas ao ponto de agir como antiviral. Na pandemia de SARS-CoV-2, iniciada em 2019, alguns estudos começaram a aplicar a heparina ao tratamento de pacientes infectados, devido à grande incidência de coágulos sanguíneos apresentados pelos pacientes. Ainda não se tem certeza sobre quais mecanismos de ação conferem resultado positivo ao emprego do fármaco. Não se sabe se é apenas devido à anticoagulação da heparina ou se, em algum grau, é um efeito de sua atividade antiSARS-CoV-2 (KIM *et al.*, 2020; KWON *et al.*, 2020).

A característica mais conhecida da heparina é o impedimento da formação de coágulos sanguíneos. O processo de formação e dissolução dos trombos envolve os vasos sanguíneos, as plaquetas, as proteínas da cascata de coagulação e da fibrinólise (que elimina os trombos após o reparo do vaso sanguíneo) e os anticoagulantes naturais (BROOKS; STOKOL; CATALFAMO, 2011).

Em 1964, Davie; Ratnoff e McFarlane propuseram a hipótese da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação do sangue. Esse modelo clássico mostra que todas as vias têm como objetivo a ativação do fator Xa, fator este que desencadeia o processo de formação de fibrinas, que garantem a formação de um coágulo estável (FRANCO, 2001).

Quando a inibição ocorre no fator Xa, apenas o pentassacarídeo antitrombina III (ATIII) é suficiente para catalisar a reação. Naturalmente a ATIII inibe a ação do fator Xa e outros fatores atuantes no processo de coagulação, mas quando na presença de heparina, sua ação é potencializada em até  $10^6$  vezes (DESAI, 2005).

A atividade anticoagulante da heparina acontece com a interação entre a ATIII ligada pelo pentassacarídeo 3-O-sulfato. Este fato gera mudança conformacional, elevando a capacidade de ligação com proteínas em cascata de coagulação. A inibição da trombina, por sua vez, necessita de 16 a 18 unidades de sacarídeos, os quais são moléculas maiores que dificultam o estabelecimento do processo (DESAI, 2005). O cofator II da



heparina (HCII) é outro inibidor das proteínas da cascata de coagulação que tem sua atividade aumentada na presença de heparina, passando de cerca de 5 minutos para 50 milissegundos para reduzir em 50% a atividade da trombina, quando presente numa concentração de 1  $\mu\text{mol/L}$  (TOLLEFSEN; PESTKA, 1985). Esse aumento na ação do fator Xa e do HCII caracteriza a heparina como um fármaco anticoagulante e antitrombótico de grande aplicação.

O entendimento da relação estrutura-atividade fez surgir nova classe potente de inibidores de trombina sintéticos. Outras proteínas de ligação à heparina, como inibidor da via do fator tecidual (TFPI) 2 e anexinas, também podem desempenhar papéis importantes na anticoagulação sanguínea.

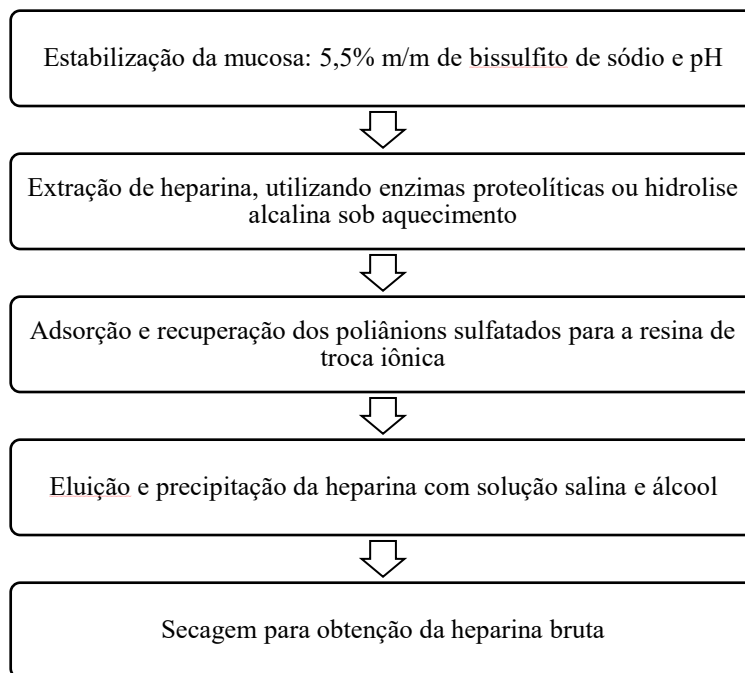
O desequilíbrio dessa cadeia de reação tem como principal efeito a formação de coágulos no sistema circulatório, sem a lesão em vasos. Esses coágulos podem bloquear a passagem de sangue no mesmo ponto onde se formam ou se desprender e circular pelo corpo, podendo causar trombose venosa profunda, embolia pulmonar, isquemia cardíaca ou acidente vascular cerebral (HEIT, 2008; PREVITALI *et al.*, 2011).

### **2.1.2 Produção industrial**

Geralmente, os processos utilizados pela indústria figuram sob sigilo. Meer; Kellenbach; Bos (2017) fizeram uma compilação de informações sobre esses processos, baseando-se em artigos científicos e patentes, e concluiu que as principais etapas são comuns à maioria deles, inclusive em indústrias brasileiras.

O processo de produção da heparina começa nos abatedouros, de onde são extraídas as mucosas animais contendo o composto de interesse. Os animais que passarão pela extração devem atender aos padrões de qualidade e sanidade exigidos para o consumo humano. Desde 2013, a cadeia de fornecimento de heparina é abrangida pelo EudraLex, orientações da União Europeia relativas às boas práticas de fabricação de medicamentos para uso humano e veterinário. A Figura 2 mostra diagrama simplificado do processo de produção da heparina.

Figura 2: Diagrama do processo de produção



Um procedimento típico começa com a remoção do conteúdo do intestino e subsequente imersão deste em uma solução salina. Após a imersão, a mucosa é raspada dos intestinos, produzindo aproximadamente 0,8 kg de mucosa por suíno. Algumas empresas coletam os intestinos inteiros para posterior processamento (VREEBURG; BAAUW, 2010).

Uma reação que pode ocorrer durante o armazenamento prolongado dessa mucosa é a dessulfatação química ou enzimática, fato que gera redução da atividade anticoagulante. Visando à estabilização da mucosa, pode-se utilizar um removedor de oxigênio, como por exemplo o bissulfito de sódio, o qual também limita o crescimento microbiano (VREEBURG; BAAUW, 2010).

A heparina é disponibilizada no meio utilizando-se temperaturas e pressões elevadas ou proteases, sendo recuperada por meio de precipitação utilizando-se sais de amônio quaternário ou resina de troca iônica. Esses compostos podem ser adicionados diretamente no caldo hidrolisado, permanecendo em contato com este durante o tempo necessário para que ocorra a adsorção. É importante que os parâmetros de controle apresentem pouca variação durante todo o processo para minimizar a adsorção de contaminantes e compostos indesejados (MEER; KELLENBACH; BOS, 2017).

Após a precipitação ou adsorção da heparina, as impurezas são removidas por lavagem e o composto de interesse é recuperado em solução de cloreto de sódio. A solução concentrada de heparina bruta é então dessalinizada por ultrafiltração ou precipitada com etanol e seca.

Após esta etapa de branqueamento, a maioria das propriedades da heparina é estabelecida, citando-se como exemplo: composição molecular, perfis de impureza, segurança microbiana e cor. Portanto, a otimização dessas etapas garante rendimentos máximos na obtenção da heparina bruta, primeiro produto do processo.

A heparina bruta precisa passar por análises físico-químicas visando garantir a presença mínima de solventes residuais. Para obtenção do produto, uma secagem precisa ser feita, garantindo seu conteúdo e minimizando riscos aos pacientes de resíduos químicos do processo de obtenção continuarem presentes na amostra final. Por meio da heparina bruta também são obtidas as heparinas com massas molares definidas, sendo que cada faixa de massa molar apresenta determinada especificidade de atuação.

## 2.2 HEPARINA DE BAIXA MASSA MOLAR

As heparinas de baixa massa molar (HBPM), com massa molar média de 4 a 6 kDa, são derivadas da heparina, possuem propriedades anticoagulantes e devem ter uma potência superior a 70 unidades/mg de antifator Xa e uma razão de atividade do antifator Xa para atividade do antifator IIa  $> 1,5$  (LINHARDT; SIBEL GUNAY, 1999; RAPOSO DE MELLO, 2010; VISKOV *et al.*, 2009).

O desenvolvimento da HBPM foi facilitado quando foi compreendido como funcionava a cascata de coagulação. Nesta, um fator ativa o próximo até que a protrombina (fator II) seja convertida em trombina (fator IIa) pelo fator Xa, pois é a trombina quem vai formar o coágulo de fibrina (LINHARDT, 2003).

Entender a atividade do fator Xa no processo de coagulação estimulou o desenvolvimento de um composto mais específico que a heparina bruta. Este composto atua em muitos pontos da cascata de coagulação, podendo, assim, diminuir os riscos da aplicação da heparina. Estudos observaram ao longo dos anos que o fracionamento da heparina fazia com que sua atividade contra a trombina (fator IIa) diminuísse mais drasticamente do que sua atividade contra o fator Xa, tornando-a mais eficiente e com menores riscos aos pacientes (LINHARDT, 2003).

Embora seja muito estável, a heparina pode ser decomposta. As HBPM são formadas por meio de hidrólise química ou enzimática. As diferenças estruturais estabelecidas neste processo interferem nos efeitos clínicos das HBPM. Estas diferenças estruturais, mostradas pela Figura 3, demonstram a importância de um processo bem estabelecido. Existem oito modos de obtenção de HBPM aprovados para uso clínico, como diferentes técnicas de despolimerização e clivagem. A Tabela 1 (COSMI; PALARETI, 2012) mostra algumas HBPM que são comercializadas mundialmente e seus diferentes métodos de produção. Observa-se que cada método de produção resulta em um fármaco diferente e isso é uma das características das HBPMs, cada método de despolimerização aplicado gera fármaco com características específicas.

Figura 3: Características estruturais das HBPM's.

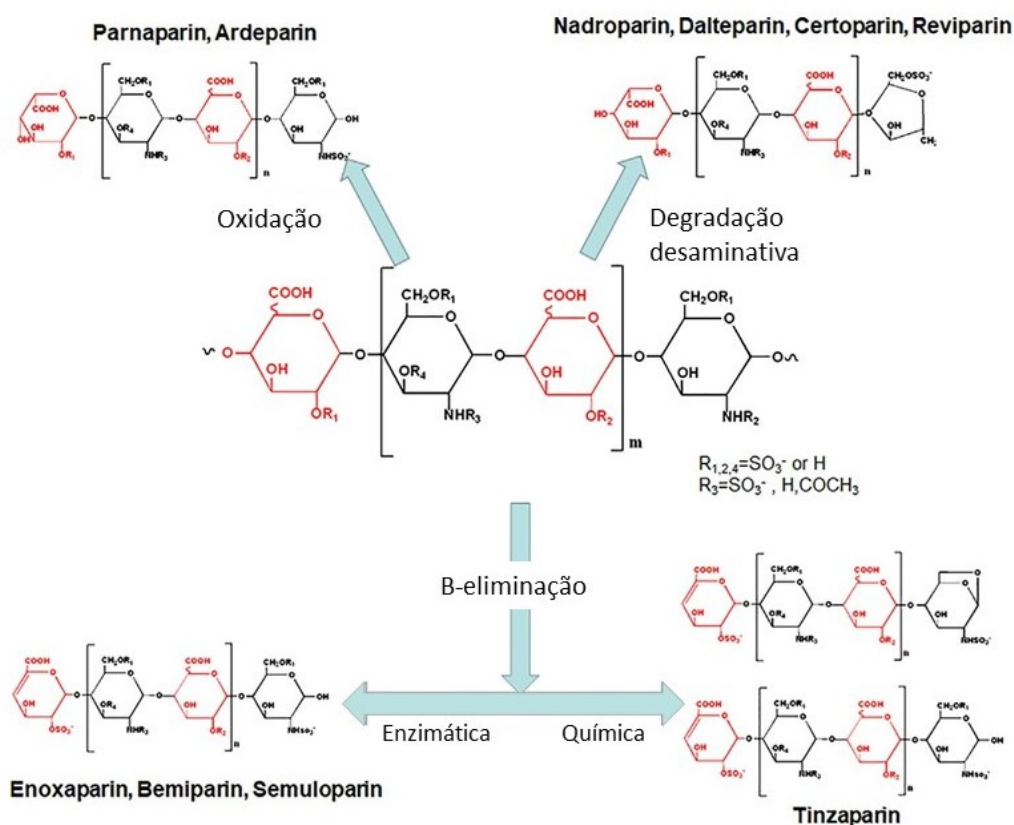


Tabela 1: Algumas das HBPMs disponíveis mundialmente

HBPM	Nome comercial	Fabricante	Método de preparação	Razão fator Xa: IIa (daltons)	Massa molar média (U)	Mercado permitido
Enoxaparin	Lovenox, Clexane	Rhone-Poulenc Rorer, Avantis, Eurofarma lab ltda, Aspen pharma	Despolimerização alcalina	2,7:1	4500	EUA, Alemanha, Espanha
Ardeparin	Normiflo	Wyeth-Ayerst	Despolimerização oxidativa com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,0:1	5600-6500	EUA
Dalteparin	Fragmin	Pharmacia-Upjohn Kissei	Clivagem desaminativa com ácido nitroso	2,0:1	4000-6000	EUA, Japão, Alemanha, Reino Unido
Nadroparin	Fraxiparin	Sanofi-Winthrop	Clivagem desaminativa com ácido nitroso	2,4:1	4500	Alemanha, França
Parnaparin	Fluxum	Alfa Wassermann	Despolimerização oxidativa com Cu <sup>+</sup> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3:1	4500-5000	Itália
Reviparin	Clivarin	Knoll	Clivagem desaminativa com ácido nitroso	3,5:1	4300	Alemanha, Canadá
Tinzaparin	Innohep, Logiparin	Braun, Novo/Leo/Du pont	Clivagem eliminatória beta por heparinase	2:1	4900	Alemanha, Dinamarca
Gammaprin	NA	Corcon Pharmaceutica I	Irradiação gama	NA	NA	NA
Bioparin	NA	Bioberica	NA	NA	NA	EUA
Sandoparin	Clivarine, Embolex	Sandoz, Novartis, Biochemie	Clivagem desaminativa com nitrito de isoamil	NA	NA	EUA, Áustria, Suíça
Fondaparinux	Arixtra	GSK, Dr. Reddy's lab	Pentassacarídeo sintético	NA	NA	EUA
Idraparinux	Xarelto®	Sanofi-aventis	Pentassacarídeo sintético	NA	NA	NA

As HBPM oferecem grande vantagem sobre a heparina bruta no que tange às suas propriedades farmacocinéticas/farmacodinâmicas aprimoradas, resultando em meias-vidas biológicas mais longas e em sua biodisponibilidade subcutânea aprimorada (CASU; NAGGI; TORRI, 2015; LINHARDT; SIBEL GUNAY, 1999). Como resultado, a HBPM pode ser administrada em injeções subcutâneas todos os dias, permitindo seu uso clínico em pacientes ambulatoriais. Este fato reduziu os custos de hospitalização geralmente associados ao uso intravenoso de heparina (COSMI; PALARETI, 2012).

As heparinas de baixa massa molar comerciais são sais sulfatados de heparina, com massa molar menor que 6 kDa, produzidos por meio de despolimerização ou fracionamento da heparina bruta (INGLE; AGARWAL, 2014). Geralmente envolvem condições intensas de processamento e diversos reagentes, fato que altera a conformação das unidades sacarídeas. (RAPOSO DE MELLO, 2010).

As seguintes técnicas podem ser empregadas para produção de HBPM: clivagem peroxidativa, clivagem com ácido nitroso, clivagem eliminativa química e enzimática, despolimerização química e fracionamento cromatográfico (ACHOUR *et al.*, 2012; INGLE; AGARWAL, 2014). Jandik, Kruep, Cartier, & Linhardt (1996) observaram que a despolimerização da heparina apresentou variação da via de obtenção conforme o pH do meio. É importante ressaltar que em meio ácido ocorreu por hidrólise e em meio alcalino por eliminação.

A despolimerização enzimática da heparina é realizada por meio do uso de enzimas, com destaque para a heparinase de acordo com a literatura. Esta enzima libera a HBPM pelo mecanismo de  $\beta$ -eliminação (BHUSHAN *et al.*, 2017; FU *et al.*, 2014; WALENGA; LYMAN, 2013). Outras enzimas têm pouco destaque na literatura, como Wang; Liu; Voglmeir (2020) observaram em seu estudo acerca de sulfotransferases para produzir heparinas sintéticas com massa molar definida por rota quimioenzimática.

Achour *et al.* (2013) desenvolveram método que utiliza hidrólise catalisada por peróxido de hidrogênio, assistida por ondas ultrassônicas. Essa despolimerização físico-química da heparina induziu menor quantidade de oligossacarídeos com menos de cinco unidades de monossacarídeos. Isso contribui para melhor preservação da sequência de ligação ao pentassacarídeo ATIII, que resulta em uma alta proporção de Anti-Xa/Anti-IIa.

As modificações geradas pelos processos de produção de HBPM podem resultar em sequências sacarídeas não desejadas. Higashi *et al.* (2012) mostraram uma alternativa para amenizar esses processos. Fazendo a fotólise parcial da heparina não fracionada, em água destilada usando dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), obteve HBPM com capacidade anticoagulante próximo de heparinas comerciais (Enoxaparina e Dalteparina) e, ao contrário de outros processos comumente usados para preparar HBPM, a preparação fotoquímica forneceu cadeias polissacarídeas de comprimento reduzido com resíduos ímpares e pares de sacarídeos.

A enoxaparina sódica é a HBPM com maior destaque no mercado global. Sua produção ocorre pela despolimerização alcalina. É realizada por tratamento direto da heparina ou seu sal de éster benzílico de heparina com base (NaOH) sob certas condições de reação. Ocorre a clivagem química do sal de heparina, reagindo com cloreto de benzila e base, seguido de aquecimento. A despolimerização da heparina para obtenção de HBPM é feita por um solvente orgânico inerte, como diclorometano, tetra-hidrofurano, anisol e N,N-dimetil formamida (LINHARDT; SIBEL GUNAY, 1999).

Por processo desaminativo também é possível produzir HBPM. A heparina é despolimerizada usando ácido nitroso ou nitrito de isoamil. Esse preparado fornece melhor rendimento com melhores propriedades químicas e biológicas. Alguns produtos obtidos desta forma são a dalteparina e a nadroparina sódicas. A despolimerização parcial por aquecimento a 115 °C com 2-hidroxipiridina aquosa é outro método de despolimerização possível. Produz heparinas sem perdas significativas de atividade anticoagulante comparada aos demais métodos.

A partir dos estudos, nota-se que cada método aplicado resulta em conformações diferentes das estruturas da heparina obtida, por este motivo analisa-se cada método separadamente, sendo difícil a comparação entre os produtos obtidos. Cada processo produtivo resulta em uma heparina comercial diferente e voltada para uma aplicação específica.

### 2.3 PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO POR TROCA IÔNICA

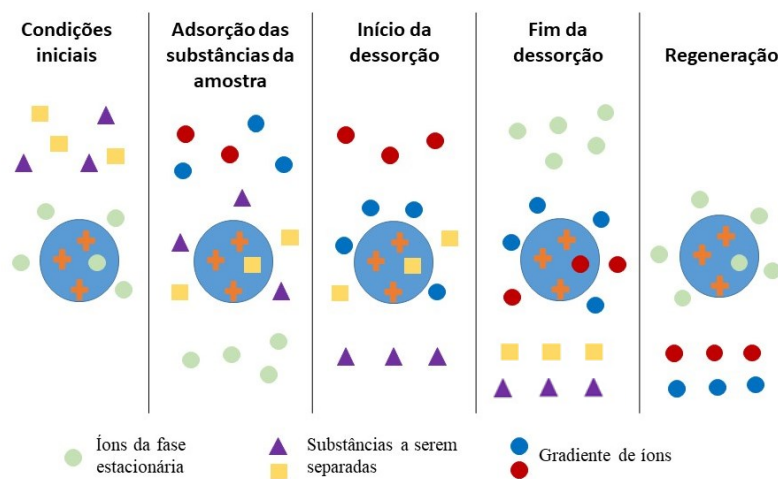
Trocadores iônicos constituem-se de uma ampla gama de materiais, entre substâncias naturais e artificiais. Para que o processo de troca iônica aconteça é necessária a presença de uma fase móvel, com a mistura de solutos a serem separados, e uma estacionária carregada de íons, constituída de uma matriz porosa, inerte, insolúvel em

água e em solventes orgânicos, apresentando ligações covalentes a grupos trocadores iônicos. Alguns líquidos também são considerados trocadores de íons e funcionam como matrizes (ABRÃO, 2014; LUCY, 2003).

Os trocadores iônicos podem ser classificados em aniônico ou catiônico. Os aniônicos apresentam grupos iônicos positivos fixos à matriz, enquanto os catiônicos apresentam íons negativos. Visando preservar a neutralidade elétrica, este sólido deve conter íons móveis ou deslocáveis de carga oposta. Quando os íons fixos da matriz são negativos, os íons deslocáveis ou trocáveis devem ser positivos, o caso contrário também é verdadeiro (ABRÃO, 2014; YAGINUMA, 2007).

Os íons trocáveis típicos para o trocador catiônico são:  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Th^{4+}$ ,  $FeCl_2^+$ ,  $Cu(NH_3)_4^{2+}$  e íons orgânicos  $RNH_3^+$ ,  $R_4N^+$ . Os íons trocáveis típicos para o trocador aniônico são:  $OH^-$ ,  $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $HSO_4^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $H_2PO_4^-$ ,  $FeCl_4^-$ ,  $ZnCl_3^-$  e íons orgânicos  $R-COO^-$ . A Figura 4 (YAGINUMA, 2007) mostra o processo de troca iônica.

Figura 4: Esquema de mecanismo de troca iônica.



Como mostra a Figura 4, primeiramente há o equilíbrio entre matriz e fase móvel. O segundo estágio mostra a adsorção da amostra, liberando íons da fase estacionária em quantidade equivalente à adsorvida, com alterações da posição e origem do sítio de troca. Esses sítios de troca são íons capazes de estabelecer ligação com íons de carga oposta. Isso se dará mais facilmente quanto maior for a força de ligação estabelecida.



No terceiro estágio, tem-se o início da dessorção. As substâncias retidas serão eluídas, processo que pode ser acelerado com a introdução de um gradiente crescente de concentração de um sal. Os estágios 4 e 5 mostram o fim da adsorção e o reestabelecimento das condições iniciais de processo, restabelecendo a coluna.

Alterando a força iônica dos materiais, os eluentes, pH, entre outros, é possível controlar a retenção e liberação de substâncias de interesse (LEVAN; CARTA; YON, 1999).

Além de serem classificadas como aniônicas e catiônicas, as resinas de troca iônica podem ser classificadas de acordo com os grupos iônicos funcionais fixados à matriz, sendo eles:

- 1- resinas aniônicas, forte e fraca;
- 2- resinas catiônicas, forte e fraca;

A terminação forte e fraca para a classificação das resinas é uma referência à força que o grupo iônico afixado tem de se dissociar completamente ou não (ABRÃO, 2014; LEVAN; CARTA; YON, 1999).

As resinas modernas são hidrocarbonetos altamente polimerizados, com ligações cruzadas, contendo grupos ionizados. A estrutura fundamental da resina pode ser vista como um íon grande, permeável, insolúvel, que não difunde, obtido na forma de um polímero de rede cruzada tridimensional. Esta estrutura está associada a um íon oposto, de livre ação para migrar para dentro e para fora da estrutura cruzada da resina sob condições de troca iônica (ABRÃO, 2014).

As resinas, empacotadas em colunas de leito fixo, apresentam limitações difusionais. Uma vez que a difusão de compostos com alta massa molar é lenta, observa-se dependência da difusão intrapartícula para o transporte das moléculas até os sítios de adsorção, tornando necessária a operação a baixas vazões e, conseqüentemente, o aumento no tempo de processo.

Aliado a isso, a lei de Darcy (Equação 1) mostra que a vazão  $Q$ , que permeia um meio poroso, confinado em uma coluna, é diretamente proporcional ao quadrado do diâmetro  $D$  da coluna e inversamente proporcional à altura  $L$  do leito, a uma dada queda de pressão  $\Delta P$ :

$$Q = \frac{\pi k \Delta P D^2}{4 \pi L} \quad (1)$$

onde:  $k$  = permeabilidade do leito e  $\mu$  = viscosidade dinâmica do líquido.

Assim para maximizar a vazão, mantendo-se a mesma  $\Delta P$  seria necessária uma pequena altura de leito, o que requer grande diâmetro de coluna.

#### 2.4 PROCESSOS DE FRACIONAMENTO POR DIFERENÇA DE MASSA MOLAR

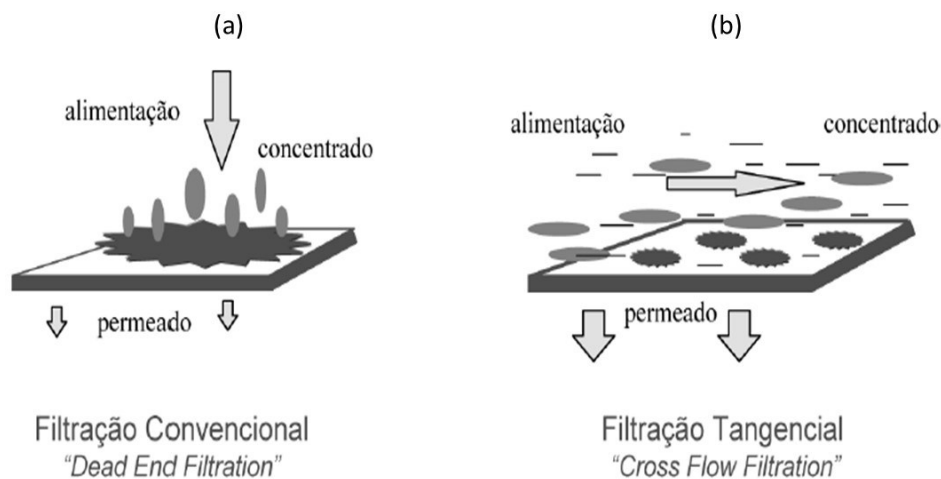
A separação de compostos em misturas com diferentes massas molares tem aplicação em processos habituais de indústria de alimentos, farmacêutica e biotecnológica. A utilização de membranas visando à separação de compostos teve início na década de 70. Visando agregar valor à subprodutos, as indústrias começaram a aplicar membranas sintéticas como barreiras seletivas (HABERT, BORGES, NOBREGA 2006).

Os processos de separação com membranas apresentam muitas vantagens frente a processos tradicionais de separação. Por não envolverem mudanças de fase, têm menor consumo energético, alta seletividade, operam em condições brandas de temperatura, podendo ser aplicados em produtos termolábeis e são facilmente escalonáveis (KUMAR *et al.*, 2013; MULDER, 2000).

De modo geral, processos com membranas separam duas fases. O permeado, ou filtrado é a fase que atravessa a membrana, carregando consigo, em sua maioria, solutos com massa molar menor que a massa molar de corte da membrana. O concentrado, ou retido ou retentado, por sua vez, é a fase que permanece na alimentação, a qual contém os demais solutos (MULDER, 2000).

As membranas podem ser classificadas de acordo com sua morfologia, estrutura, material e configuração. Em um Processo de Separação por Membrana - PSM também difere o modo de operação, visto que o escoamento pode ser de modo convencional (*dead-end filtration*) ou tangencial (*crossflow filtration*). No caso do modo convencional, a solução esco perpendicularmente à superfície da membrana, apresentando um rápido acúmulo de componentes da solução sobre esta (Figura 5a). No processo com escoamento tangencial (Figura 5b), a solução esco paralelamente a sua superfície, fato que limita o acúmulo de componentes sobre a membrana, tornando mais eficiente o processo (CHERYAN, 1998; HABERT, BORGES, NOBREGA, 2006; MULDER, 2000).

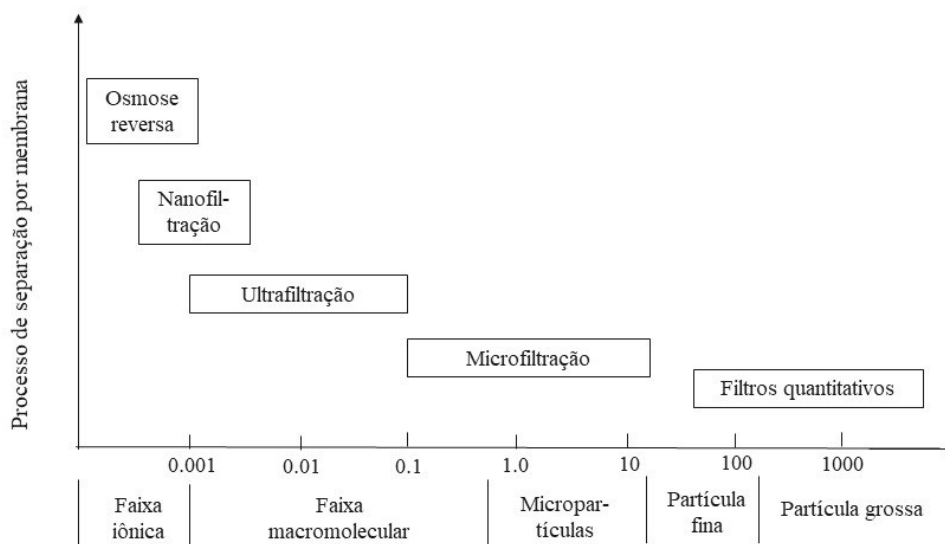
Figura 5: Modos de operação em processos de separação com membranas: convencional (a) e tangencial (b)



Os processos de permeação com líquidos geralmente utilizam como força motriz a diferença de pressão, como por exemplo, a microfiltração - MF, a ultrafiltração - UF, a nanofiltração - NF e a osmose inversa - OI. Os processos de MF e de UF baseiam-se em uma barreira porosa e possuem como mecanismo de separação a exclusão por tamanho de poros. É importante ressaltar que o transporte por meio dos poros ocorre por convecção. A OI, por sua vez, utiliza membranas densas em que prevalecem os mecanismos de solubilização e difusão. A NF enquadra-se em uma faixa de transição entre a UF e OI, pois possui superfície carregada. O mecanismo de separação combina os efeitos de exclusão de tamanho e de Donnan. De um modo geral, definiram-se as seguintes faixas de pressão: entre 0,2 e 3,5 bar, para a MF; 0,5 a 5,0 bar, para a UF; 1,5 a 40 bar para a NF; e de 20 a 100 bar, para a OI (CHERYAN, 1998; MULDER, 2000).

De acordo com os tamanhos dos poros da membrana utilizada têm-se diferentes possibilidades de aplicação, como mostra a Figura 6 (CUI, MURALIDHARA, 2010). De acordo com a faixa de massa molar desejada podem ser aplicadas diferentes membranas.

Figura 6: Variações de aplicabilidade em diferentes processos de separação com base em tamanhos de poros.



Giacobbo (2015) estudou a separação de polissacarídeos com diferentes membranas e observou que ao sequenciar processos de separação com membranas de diferentes tamanhos de poros conseguiu separar diferentes moléculas. Em uma primeira fase, a MF faz uma purificação do caldo de estudo, que segue para uma UF, visando a retenção e concentração dos polissacarídeos do caldo. Já Marcati *et al.*(2014) desenvolveram um processo de permeação por membrana em duas etapas usando membranas planas de polietersulfona para recuperar polissacarídeos da biomassa de *Porphyridium*. Uma primeira ultrafiltração produziu polissacarídeos de alto peso molar de maneira eficiente, enquanto a ultrafiltração separou polissacarídeos de baixa massa molar de proteínas.

## 2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos sobre a heparina costumam ser desafiadores devido à complexidade de sua estrutura química e capacidade de interação com outras moléculas. Nos últimos anos, novos métodos químicos, quimioenzimáticos e por bioengenharia foram introduzidos para preparar heparinas HBPM e ultraHBPM (BAYTAS; LINHARDT, 2020). Muito se pesquisa sobre a obtenção destas heparinas com massa molar menor partindo de heparinas brutas comerciais, e não do extrato animal, sendo este um segundo

processamento totalmente independente do processo de obtenção da heparina primária, aquela extraída de animais. Como o interesse maior está nas heparinas com massa molar definida, estabelecer um processo que resulte em um material com moléculas de heparina mais concentradas em uma faixa molar específica tornaria o processo mais eficiente, com menor risco de contaminação e provavelmente com custo menor.

A síntese química da heparina requer etapas repetitivas de proteção, ativação, acoplamento e reações de desproteção, o que acarreta processos trabalhosos, como exemplo temos a síntese de fondaparinux, uma HBPM comercial, que originalmente exigia "60 etapas químicas e tinha rendimento de 0,1%" (TURPIE *et al.*, 2002). Por isso, o uso de síntese enzimática, para evitar a adição de compostos químicos e tentar diminuir o número de etapas, surgiu como uma via alternativa a síntese química.

Junto disso, visto que alguns trabalhos demonstram a eficiência da aplicação de ultrafiltração na heparina de 1ª geração para a produção de HBPM (FU *et al.*, 2014 e YE *et al.*, 2009), buscou-se sequenciar a hidrólise e a ultrafiltração para se obter uma separação por massa molar desse caldo hidrolisado contendo heparina. Assim, ao final do processo, as frações permeadas poderiam conter maior quantidade de moléculas de heparina dentro de uma faixa molar específica, aqui com massa molar de corte definida em 5 kDa.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

Foram avaliadas quatro enzimas proteolíticas exógenas do tipo subtilisina, Savinase® 16L ( $7 < \text{pH} < 11$  e  $55 < T < 75$ ), Savinase® 12T ( $7 < \text{pH} < 11$  e  $55 < T < 75$ ), Alcalase® 2.5L ( $6,5 < \text{pH} < 10$  e  $60 < T < 75$ ), e Alcalase® 3.0T ( $6,5 < \text{pH} < 10$  e  $60 < T < 75$ ), doadas pela empresa Novozymes® (Dinamarca). Essas enzimas foram sugeridas pela empresa por apresentarem bom desempenho frente a hidrólise de glicoaminoglicanos.

Para o processo convencional comparativo, uma resina de troca iônica cedida pela empresa Purolite (EUA), foi aplicada (Purolite® A860S - reticulado de poliacrílico macroporoso com divinilbenzeno).

Para a análise por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) foi utilizado como padrão a heparina sódica Chiesi 5000 UI/mL (Chiesi Farmacêutica Ltda, SP).

A membrana utilizada foi a UH004 (Microdyn-Nadir, Alemanha). UH004 é uma membrana de polietersulfona para ultrafiltração, onde pode ser aplicado líquidos em temperatura máxima de  $95^{\circ}\text{C}$ , com faixa de pH 0 - 14, com fluxo máximo de  $477,4\text{m}^3/\text{dia}$ .

A mucosa suína foi cedida pela BRF Foods, unidade de Concórdia, município localizado no Estado de Santa Catarina – SC. A mucosa foi entregue em temperatura ambiente, sem nenhuma adição de compostos, em lote único. Visando o armazenamento, a amostra foi homogeneizada por 10 segundos em homogeneizador mecânico com potência de 1200 watts em porções de 500 gramas e adicionado 0,8% m/m de metabissulfito de sódio, e em seguida congeladas. A Figura 7 mostra a mucosa suína homogeneizada.

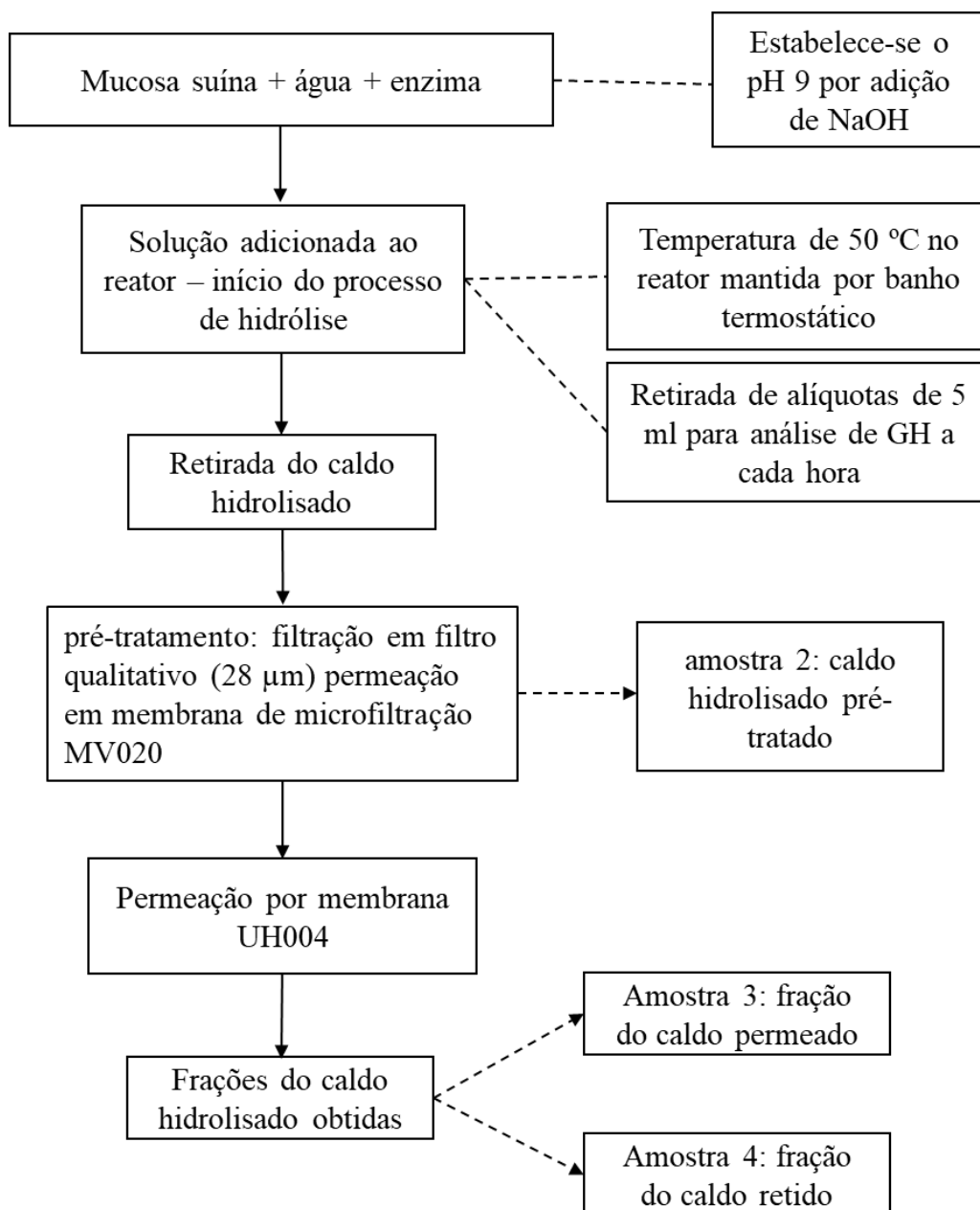
Figura 7: Mucosa suína homogeneizada.



### 3.2 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HEPARINA POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O processo para a obtenção da heparina bruta por hidrólise enzimática foi estruturado conforme a Figura 9 apresenta.

Figura 8: Fluxograma do processo de obtenção das amostras estudadas.



Para a determinação da quantidade de água adicionada na mistura a ser hidrolisada, quantidade de preparado enzimático, pH, temperatura, agitação e tempo de hidrólise, foram realizados ensaios preliminares como descrito no item 3.5.1. Esses ensaios definiram as condições de processo que foram usadas em sequência.

Assim, o caldo a ser hidrolisado passou a ser composto pela mucosa suína previamente preparada, adicionada de 20% de água ultrapura em relação à massa total de



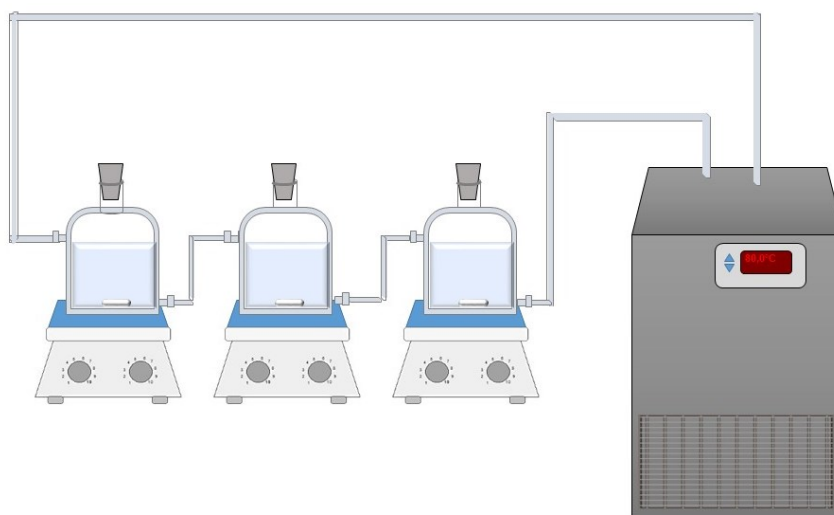
mucosa, e a enzima em estudo, na concentração de 0,1%. O pH era regulado para 9 com hidróxido de sódio (Synth). Essa solução era colocada nos reatores para hidrólise.

A temperatura do banho era regulada a 50 °C e controlada por meio do painel de controle do banho termostático. Manteve-se a agitação de 200 rpm durante todo o processo, retirando-se alíquotas para análises em tempos pré-determinados.

Ao final do período de hidrólise, o caldo hidrolisado era centrifugado à 5000 rpm por 30 min e fase líquida direcionada para filtração em filtro qualitativo (28 µm) e, em sequência, o filtrado era submetido a uma segunda permeação em membrana de microfiltração MV020 (Microdyn-Nadir Us Inc, Alemanha), a fim de melhorar a remoção do particulado. O filtrado obtido seguia para o processo de ultrafiltração utilizando a membrana UH004 (Microdyn-Nadir Us Inc, Alemanha).

### 3.2.1 Aparato experimental para a realização dos ensaios de hidrólise enzimática

Para a realização da hidrólise enzimática da mucosa, utilizou-se um sistema de reatores de vidro encamisados com controle de temperatura (banho termostático – Quimis, BR) e agitação controlada (agitadores magnéticos - color Squid Ika, Staufen, Alemanha). A Figura 8 mostra o esquema do sistema de hidrólise utilizado.



### 3.2.2 Definição das condições de processo

Parâmetros de hidrólise como temperatura, te agitação, concentração de enzima e de substrato, foram estudados para definição das condições ótimas de processo.

Para o estudo da adição de água ao meio reacional foram avaliadas concentrações de 0%, 10%, 20% e 50% de água em relação à massa de mucosa. Neste teste, utilizou-se os seguintes parâmetros operacionais: enzima Savinase 16L com 0,8% de concentração em relação ao teor de proteína da massa de mucosa, pH 9, 50 °C e agitação de 300 rpm. O processo foi realizado pelo período de 6 horas, avaliando-se o GH obtido ao final desse tempo. A tabela 2 apresenta o planejamento fatorial aplicado.

Tabela 2: Níveis do planejamento fatorial aplicado para determinação das concentrações de enzima e substrato do processo de hidrólise para cada enzima.

Nível	-1	0	1
enzima	0,1%	0,45%	0,8%
substrato	40%	60%	80%

O segundo parâmetro estudado foi a agitação. Avaliou-se o uso de 100, 200 e 300 rpm, mantendo constante pH 9 e 50 °C, com concentração de enzima Savinase 16L 0,8% em relação ao teor de proteína da massa de mucosa e 20% de água adicionada.

Visando definir o melhor pH e temperatura de cada enzima, montou-se um planejamento experimental 2<sup>2</sup> para cada uma das 4 enzimas em estudo, mantendo constante a concentração de enzima aplicada em 0,8%, 20% de água adicionada e agitação de 200 rpm. A Tabela 3 mostra esse planejamento.

Tabela 3: Níveis do planejamento fatorial aplicado para determinação do pH e temperatura do processo de hidrólise.

Nível	-1	0	1
Temperatura (°C)	40	50	60
pH	8	9	10

Foram analisadas as quatro enzimas em estudo: Savinase® 16L, Savinase® 12T, Alcalase® 3.0T e Alcalase® 2.5L. Essas enzimas foram escolhidas para estudo conforme indicação do fabricante de enzimas que apresentavam bom desempenho frente a hidrólise de GAGs. O objetivo foi escolher uma enzima que apresentasse o melhor desempenho

por meio da avaliação do grau de hidrólise por Sorensen (GH) para o material inicial em questão. Nesta avaliação, foi realizado um teste comparativo mantendo as condições descritas no item 3.5.1 em processo de hidrólise por período de 6, 12, 24, 48 e 96 h. Ao final de cada tempo, foram coletadas amostras e determinou-se o GH pelo método de Sorensen (Item 3.7.2).

### 3.2.3 Purificação por membrana

Os ensaios de permeação foram realizados em uma célula de permeação *dead-end*, escala laboratorial, feita de aço inoxidável, com volume de 500 mL e área filtrante de 10 cm<sup>2</sup>. A força motriz utilizada foi a pressão exercida pela injeção de ar comprimido na parte superior da célula e regulada por um manômetro digital (0- 5 bar). Para o controle da pressão de operação e a despressurização do sistema foi utilizada uma válvula reguladora.

Antes da permeação do caldo hidrolisado, foi realizada a compactação da membrana com água ultrapura. Nessa etapa, a pressão utilizada foi de 5 bar com coletas de fluxo de permeado durante 1 min, a cada 15 min. Este procedimento se repetiu até a obtenção de um fluxo de permeado constante, indicando a compactação da membrana. Após esse processo, a água era retirada da célula e o caldo hidrolisado, com pH 9 era inserido na célula e submetido à permeação.

Para a purificação do caldo, a membrana UH004 (Microdyn-Nadir, Alemanha) foi escolhida baseando-se na massa molar que se desejava obter, visto que a fração molar que mais apresenta ação anticoagulante é de heparina entre 3-5 kDa (LINHARDT, R. J.; SIBEL GUNAY, N. U. R, 1999). Como condicionamento da membrana, esta foi imersa em etanol PA 99% (Synth) por 2 horas, enxaguada com água ultrapura e após isso imersa em água ultrapura por 12 horas a fim de retirar possíveis preservantes e preencher os poros da membrana com água.

O fluxo permeado (J) foi calculado com base na Equação 2.

$$J = m / (t \times A) \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

J= fluxo permeado (kg/hm<sup>2</sup>);

m= massa coletada (kg);

$t$  = tempo (h); e

$A$  = área de permeação ( $m^2$ ).

Os ensaios de permeação do caldo hidrolisado foram realizados a 5 bar, temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ C$ ) e sob agitação, essas condições foram definidas segundo estudos anteriores realizados pelo grupo. A Figura 10 (a) mostra o sistema fechado e a (b) mostra as peças que compõe o sistema de filtração. A Figura 11, por sua vez, mostra esquematicamente esse sistema.

Figura 9: Sistema de permeação *dead-end* utilizado para a ultrafiltração por membrana (a) e peças do sistema de permeação (b).

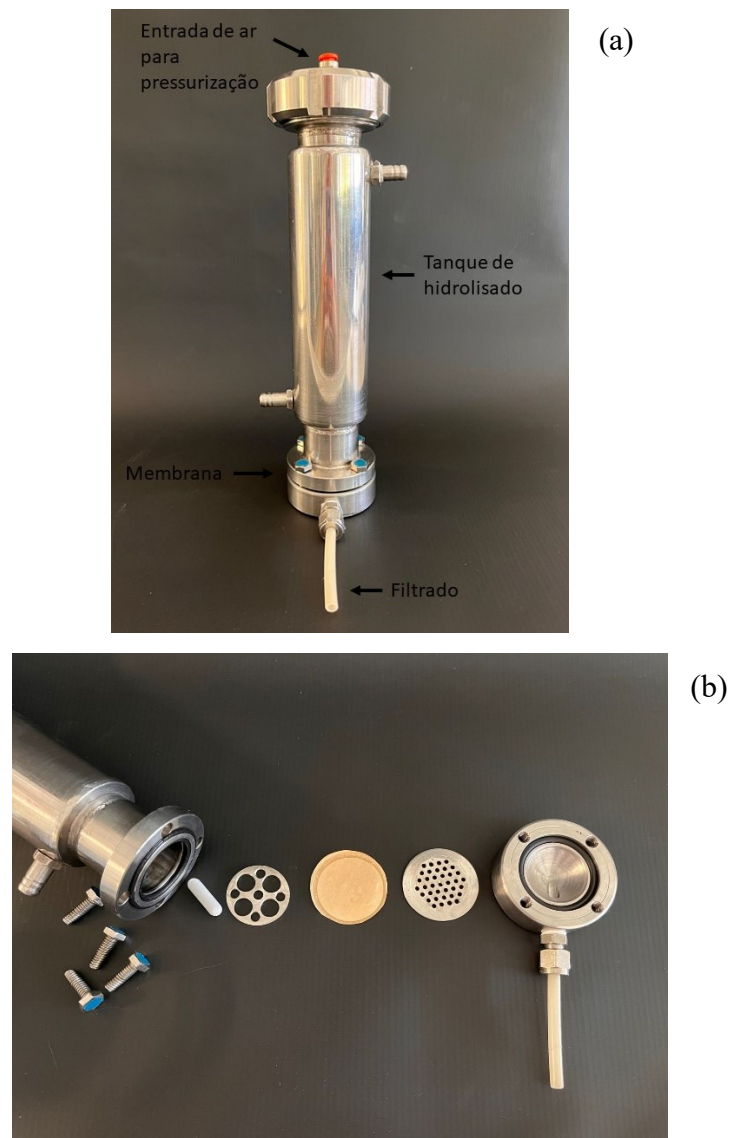
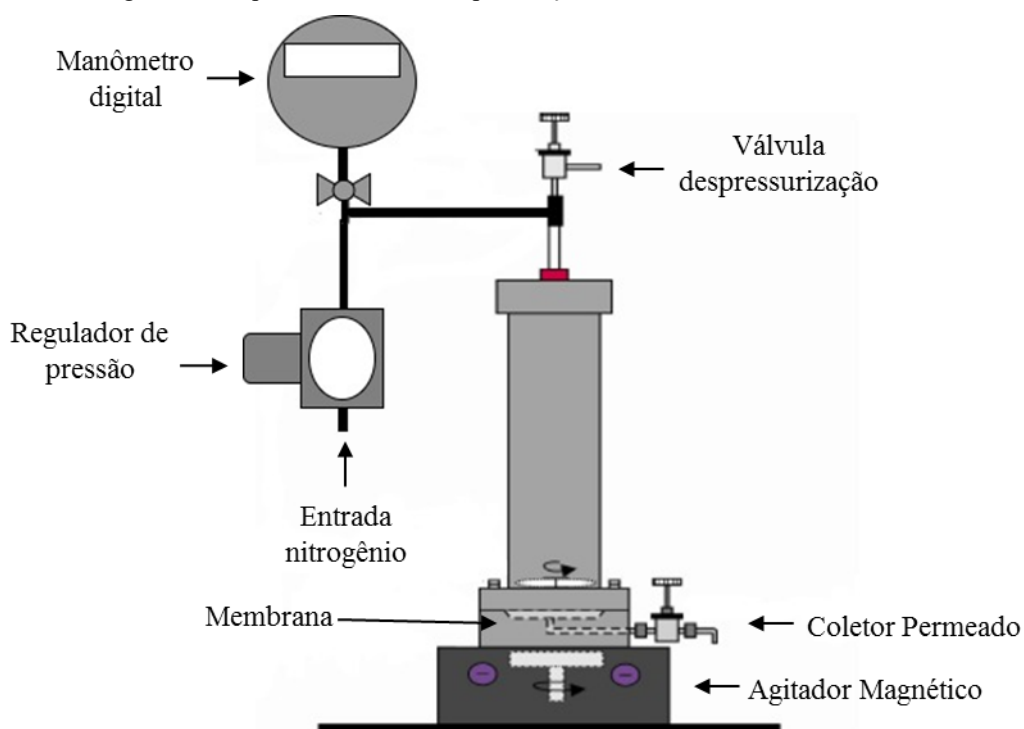


Figura 10: Esquema de sistema de permeação com membranas.



Adaptado de PRONER (2018)

### 3.3 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE HEPARINA COM A RESINA A860S – PROCESSO UTILIZADO COM MAIS FREQUENCIA NA INDÚSTRIA

Para comparação com o processo estudado aqui, uma amostra foi produzida aplicando um processo já conhecido industrialmente. O processo para a produção da amostra 1 é relatado a seguir.

- Preparação da Resina Purolite A860S

A resina foi lavada com água destilada por 20min e submetida a lavagens consecutivas com solução de 2mol/l HCl → solução de 2mol/l NaOH → solução de 2mol/l HCl → solução de HCl 23°Baume → e água destilada para lavagem final.

- Preparação da Solução Hidrolítica
- A solução de mucosa intestinal suína fresca foi adicionada de 5,5% m/m de sal em relação à mucosa
- Ajustou-se o pH para 9,0 e aqueceu-se a solução a 100°C por 10 minutos, após drenou-se o leito
- Aqueceu-se a solução a 95°C por 50 minutos, após drenou-se o leito ainda quente;

- Filtrou-se a solução em filtro de nylon (malha de 100 -120mesh);
- Troca iônica e adsorção
  - Adicionou-se a resina pré-tratada na solução hidrolítica (volume de resina cerca de 5% do volume da solução hidrolítica) na temperatura de 50-60°C, por 6horas.
  - Lavou-se a resina até remover todas as impurezas, incluindo a mucosa, com solução salina a 7°Baume. Agitou-se por 30minutos, fez-se repouso da solução por 15-30minutos, retomando a agitação por mais 30minutos, depois drena-se a solução.
- Eluição
- Fez-se a passagem de duas soluções: salmoura a 20°Baume e salmoura a 20-24°Baume
- Filtrou-se a solução e remover as impurezas
- Precipitação
- Adicionar à solução eluida em álcool 80-90graus. Agitou-se por 15-30minutos, foi vedado e aguardado por 24horas;
- Após esse período, removeu-se a fase superior da solução, essa solução contém a heparina extraída. Essa foi seca em um secador entre 60-70°C.

### 3.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS E CARACTERIZAÇÃO

#### 3.4.1 Caracterização química da mucosa suína

A composição química da mucosa suína foi determinada de acordo com os métodos descritos na AOAC (1990). As cinzas foram determinadas por incineração, em mufla a 525°C; os lipídeos por extração com éter etílico em sistema Soxhlet (Quimis Q-308G26, Diadema, SP); as proteínas foram determinadas pelo método de macro-Kjeldahl (fator de conversão de nitrogênio para proteína usado foi 6,25); a umidade por método gravimétrico a 105°C; e os carboidratos por diferença.

### 3.4.2 Determinação do grau de hidrólise (GH) - Método de Sorensen

O grau de hidrólise (GH) é definido como a porcentagem de grupamentos amino que são liberados no rompimento da molécula proteica pela ação de enzimas. Neste caso, o GH foi calculado por meio da relação entre o nitrogênio  $\alpha$ -aminado (NA) e o nitrogênio total (NT).

Para determinação do NA, utilizou-se o método de Sorensen (AOAC, 1990), baseado na titulação com formol. Uma alíquota de 5 mL de amostra foi retirada do reator a cada hora durante o processo e foram realizados os seguintes passos:

1. o pH foi ajustado para 8,3;
2. adicionou-se 5 mL de uma solução de formaldeído 37% v/v;
3. adicionou-se de fenolftaleína 0,05% v/v, também a pH 8,3; e
4. titulou-se com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> até a viragem de cor para róseo.

Com os dados obtidos na titulação, o NA foi calculado com a Equação 3.

$$NA = \frac{(V_{NaOH} - V_b) \times M_{NaOH} \times 0,014 \times 100}{\text{Massa de amostra na alíquota}} \quad (3)$$

O grau de hidrólise foi calculado por meio da Equação 4. É importante ressaltar que o valor referente ao nitrogênio total foi obtido por meio do método Kjeldahl.

$$\%GH = \frac{\text{nitrogênio } \alpha\text{-aminado (NA)}}{\text{nitrogênio total (NT)}} \times 100 \quad (4)$$

### 3.4.3 Atividade enzimática das proteases

A atividade proteolítica foi avaliada utilizando azocaseína como substrato. A mistura de reação (500 $\mu$ L) continha 100 $\mu$ L de tampão Tris-HCl (100mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0 e pH 10), 300 $\mu$ L de azocaseína a 0,8% (m/v) (em tampão Tris-HCl no pH do experimento) e 100  $\mu$ L de enzima convenientemente diluída.

Após a incubação a 40°C por 30min, a reação foi interrompida adicionando-se 600 $\mu$ L de ácido tricloroacético a 10% (m/v) (TCA). Ressalta-se que a mistura de reação foi incubada a 4°C por 10min. Após centrifugação (5600g por 20min) da mistura de reação, 800 $\mu$ L do sobrenadante foram misturados com 200 $\mu$ L de NaOH 1,8mol L<sup>-1</sup>, medindo-se a absorbância a 420nm. Uma unidade (U) de atividade de protease foi

definida como a quantidade de enzima que causou um aumento de 0,1 unidade de absorvância nas condições definidas do ensaio (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009). A unidade de atividade foi calculada por meio da Equação 4.

$$U \cdot mL^{-1} = \frac{(ABS \text{ Amostra} - ABS \text{ Branco}) * FD * 10}{0,1} \quad (4)$$

Sendo FD o Fator de diluição.

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO OBTIDO

As caracterizações aconteceram em quatro amostras:

- Amostra 1: amostra comparativa obtida por processo industrial convencional sugerido pela Purolite, item 3.3
- Amostra 2: caldo hidrolisado obtido após pré-tratamento com filtro qualitativo e permeado em membrana MV020
- Amostra 3: fração do caldo hidrolisado permeada após permeação em membrana de ultrafiltração UH004
- Amostra 4: fração do caldo hidrolisado retida após permeação em membrana de ultrafiltração UH004

#### 3.5.1 Ensaios para a detecção de heparina

Dois kits para análise de heparina foram utilizados, buscando opções de métodos de detecção rápidos e possíveis de serem aplicados em ambiente industrial. Os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos fornecidos pelos fabricantes e serão elucidados a seguir.

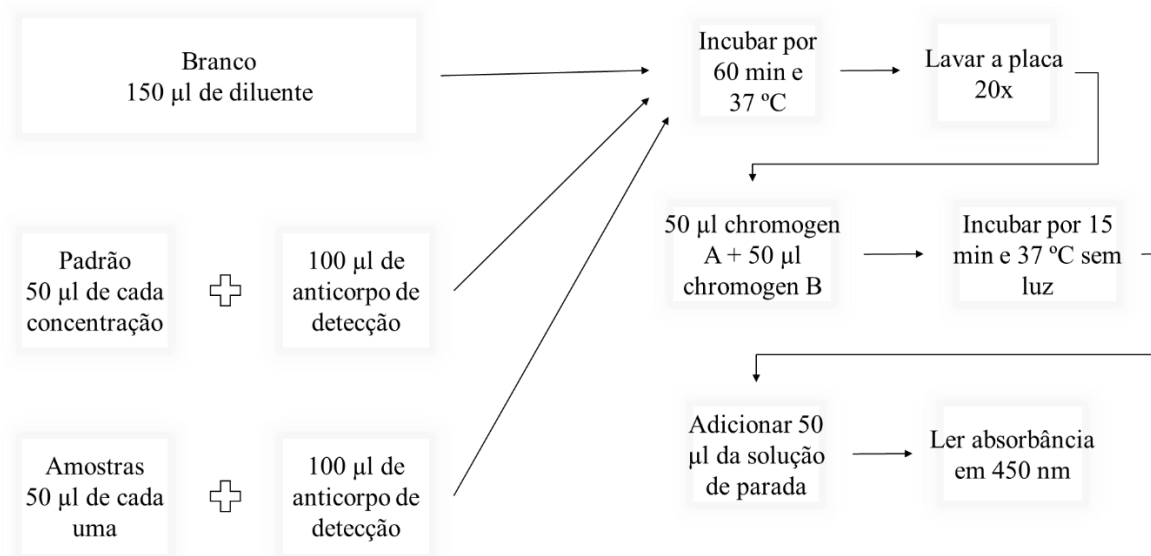
##### 3.8.1.1 Porcin Heparin ELISA Kit

O ensaio de *Porcin Heparin ELISA* mede a heparina suína em formato sanduíche ELISA. A placa de ELISA é fornecida pré-revestida com um anticorpo monoclonal anti-heparina porcina. As amostras são misturadas com um anticorpo policlonal anti-heparina porcina marcado com biotina e com a solução de estreptavidina-HRP incluída. Esta mistura amostra-anticorpo-biotina-estreptavidina-HRP é então adicionada à placa de ELISA, que é incubada por 60 min a 37 °C. O anticorpo marcado com biotina não ligado



é lavado e são adicionados corantes que alteram a cor da solução para azul. Essa solução azul tem sua cor alterada para amarela após a adição da solução de parada. A absorbância da solução amarela resultante em 450 nm corresponde à concentração de heparina porcina nas amostras. A Figura 12 mostra o fluxograma do processo de utilização do kit.

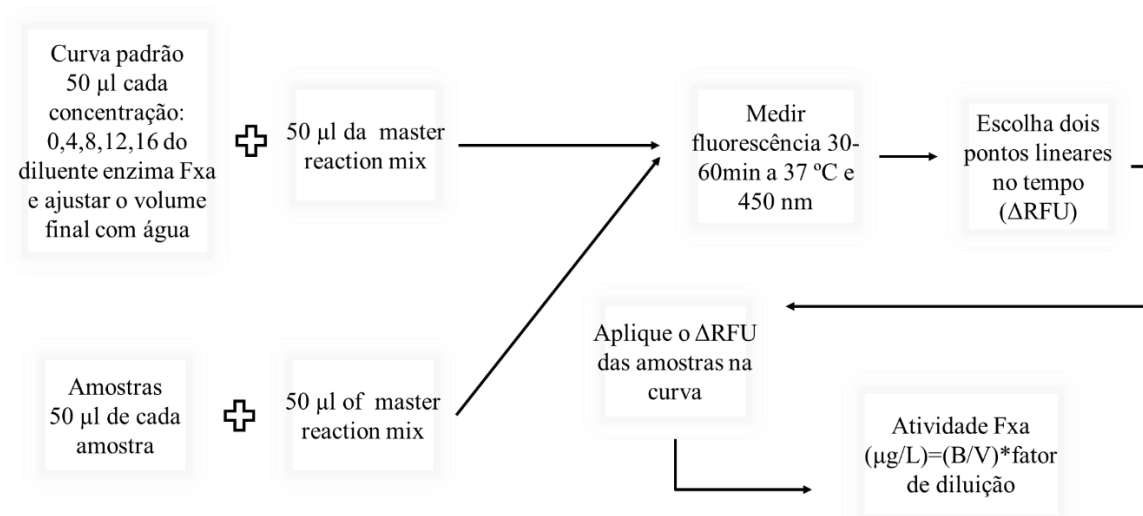
Figura 11: Fluxograma de utilização do kit *Porcine Heparin ELISA*.



### 3.5.1.2 *Factor Xa Activity Fluorometric Assay Kit*

O fator Xa (FXa) é a forma ativada do fator de coagulação X (fator Stuart-Power, tromboquinase, protrombinase, tromboplastina). O fator X é uma serina endopeptidase dependente de vitamina K que desempenha um papel importante em vários estágios da via de coagulação. É produzida no fígado e no plasma, circula como uma glicoproteína de duas cadeias. Atua convertendo a protrombina em trombina ativa por complexação com o cofator V ativado no complexo protrombinase. A heparina não fracionada e várias heparinas de baixa massa molecular ligam-se ao cofator plasmático antitrombina para inativar vários fatores de coagulação, incluindo o fator Xa. A Figura 13 apresenta o fluxograma do processo de utilização do kit de análise.

Figura 12: Fluxograma de utilização do *Factor Xa Activity Fluorometric Assay Kit*.



### 3.5.2 Análise de heparina por espectrometria de infravermelho próximo - NIR

Os espectros de transmitância das amostras do processo de hidrólise foram adquiridos em um espectrofotômetro de infravermelho próximo com transformada de Fourier da Antaris II (Thermo Fisher Scientific, EUA) com detector InGaAs e o programa computacional do sistema RESULT 3. Todas as amostras foram colocadas em cubetas de quartzo de 650 mm (Kimble Chase, Alemanha) e depois analisadas na faixa de onda de 10.000 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando-se o modo de transmissão. O número de digitalizações e resoluções adicionadas foi de 32 e 8  $\text{cm}^{-1}$  à temperatura ambiente.

### 3.5.3 Análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Analisar as amostras obtidas por FTIR permite comparar as bandas clássicas de heparina com as bandas obtidas nas amostras produzidas, obtendo evidências da presença de grupos funcionais presentes na estrutura e auxiliando na identificação e investigação da composição química da heparina.

Os espectros de infravermelho de transformada de Fourier (FTIR) de reflectância total atenuada foram registrados em um espectrofotômetro Shimadzu em triplicata, modelo IRPrestige-21 (Shimadzu, Quioto, JP), utilizando o acessório de reflectância total atenuada (ATR) de reflexão simples com cristal de diamante. As amostras foram

aplicadas no centro do dispositivo de retenção de amostras e analisadas entre 4000 e 700  $\text{cm}^{-1}$  com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . As varreduras de IR foram processadas usando apodização Happ-Genzel e representadas como porcentagem de transmitância em uma escala comum. A linha base de análise foi feita com água deionizada antes de cada leitura. Os espectros obtidos tiveram sua linha de base corrigida e normalizada usando o software IRsolution.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os efeitos das variáveis independentes investigadas sobre o GH da mucosa suína foram avaliados estatisticamente por meio de análise do planejamento fatorial, utilizando programa computacional STATISTICA versão 10, e a ferramenta estatística Experimental Design (DOE). Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância ao nível de 5% de significância. As médias e os desvios padrão foram determinados em planilha MS-Excel (Microsoft, versão 2013).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA MUCOSA SUÍNA

A Tabela 4 apresenta a composição da mucosa suína intestinal homogeneizada.

Tabela 4: Composição geral da mucosa suína.

<b>Composto</b>	<b>% Base úmida</b>	<b>%Base seca</b>
Carboidrato	2,4 ± 0,06	12,00 ± 0,06
Proteína	12,00 ± 0,80	59,00 ± 0,80
Lipídeos	4,80 ± 0,30	24,20 ± 0,30
Umidade	79,30 ± 2,30	--
Cinzas	2,50 ± 0,06	13,00 ± 0,06

Os valores em base seca são apresentados pois a concentração de enzima adicionada durante o processo baseou-se na quantidade de proteína em base seca existente na mucosa.

Desconsiderando-se a umidade da amostra, tem-se 59% de proteína. Os heparinóides de interesse presentes na amostra estão concentrados nos grânulos secretores dos mastócitos, rodeados por moléculas de proteínas hidrofóbicas com propriedade de ligação à heparina. Por este motivo, essa fração proteica é de grande interesse para a obtenção do composto. A heparina presente na amostra está diretamente relacionada a essa fração. A fração lipídica que poderia influenciar no processo de separação foi removida por centrifugação.

### 4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Realizou-se a análise da atividade enzimática das enzimas. Os resultados obtidos são mostrados pela Tabela 5.

Tabela 5: Atividade enzimática das enzimas estudadas.

Enzima	kU/mL
Savinase 16L	16
Savinase 12T	13
Alcalase 2.5L	10
Alcalase 3.0T	5

A Savinase 16L possui a maior atividade enzimática, com 16 kU/mL. A maior atividade enzimática pode ser uma das razões dos valores maiores de hidrólise obtidos com a aplicação dessa enzima, pois todas as enzimas foram adicionadas igualmente ao meio reacional.

Embora a Alcalase 3.0T tenha apresentado atividade enzimática de 5 kU/mL, seus valores de GH foram similares aos da Savinase 12T, a qual apresentou atividade enzimática de 13 kU/mL, provavelmente devido ao fato de que cada enzima interage com o substrato de forma diferente. Isto pode indicar que a redução da quantidade de enzima aplicada não causaria diminuição do grau de hidrólise das amostras.

#### 4.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Para a definição da agitação a ser utilizada nos experimentos de otimização da hidrólise enzimática, três diferentes velocidades de agitação foram avaliadas (100, 200 e 300rpm). Para estes ensaios foi utilizada a enzima Savinase® 16L na concentração de 0,8% em relação a proteína da mucosa, adicionado 20% em água enquanto o pH e a temperatura do meio foram fixados em 9 e 50 °C, respectivamente. A Tabela 6 mostra o grau de hidrólise obtido para cada rotação de agitação utilizada.

Tabela 6: GHs obtidos em duplicata, após 6 h de hidrólise, com concentração de 0,8% de enzima, 50 °C, 20% de água e pH 10.

Rotação (rpm)	100	200	300
GH (%)	23,4 ± 0,04	29 ± 0,05	26,5 ± 0,13

A rotação de 200 rpm apresentou melhor desempenho frente às demais, quando analisado os valores de GH obtidos. Analisando estatisticamente, obteve-se diferença significativa (>0,5). Considerando, ainda, que com 100 rpm não havia homogeneização do meio devido à viscosidade inicial do caldo e com 300 rpm o início do experimento era

comprometido pela instabilidade da barra magnética, optou-se por dar sequência com a agitação de 200 rpm.

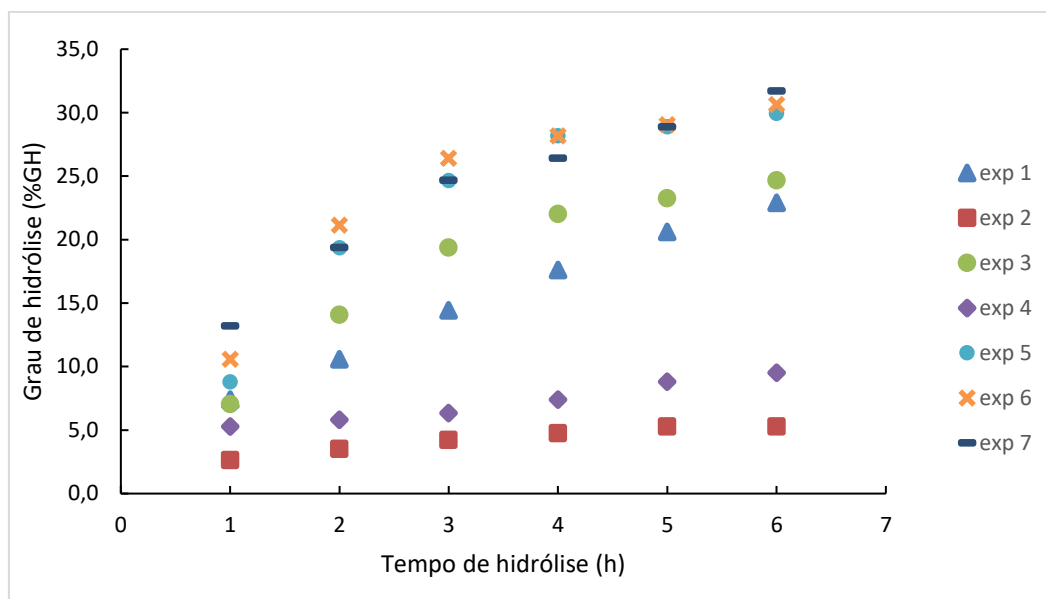
Para cada enzima estudada, o planejamento experimental foi executado, variando a temperatura entre 40 e 60 °C e o pH entre 8 e 10, de acordo com recomendações do fabricante. A Tabela 7 mostra os valores de GH obtidos no planejamento experimental após 6 horas de hidrólise.

Tabela 7: Grau de hidrólise obtido para diferentes tipos de enzimas e valores de temperatura e pH.

Exp	Temperatura	pH	Savinase 16L	Savinase 12T	Alcalase 2.5L	Alcalase 3.0T
1	-1 (40 °C)	-1 (8)	22,9	19,7	22,9	19,4
2	-1 (40 °C)	1 (10)	5,3	1,9	4,9	1,9
3	1 (60 °C)	-1 (8)	24,7	21,7	24,1	21,1
4	1 (60 °C)	1 (10)	9,5	5,6	8,8	5,5
5	0 (50 °C)	0 (9)	29,9	26,4	29,2	26,4
6	0 (50 °C)	0 (9)	30,6	26,8	28,2	26,8
7	0 (50 °C)	0 (9)	31,7	27,8	28,2	26,4

Com esses dados, pode-se observar o melhor desempenho de todas as enzimas nas condições centrais, pH 9 e 50 °C (experimentos 5, 6 e 7), condições estas sugeridas pela empresa fornecedora das enzimas como melhor condição de trabalho. Cabe observar que a Savinase® 16L foi a que apresentou maior valor de GH. A Figura 14 mostra a evolução do GH da Savinase® 16L durante as 6h do processo.

Figura 13: Evolução do GH da Savinase 16L durante as 6 h do processo.



Analisando as velocidades iniciais de hidrólise para a Savinase 16L, observa-se que o experimento 2, com pH 10 e temperatura de 40 °C, apresentou menor evolução, possuindo  $V_0 = 2,6$  %GH/h, enquanto os experimentos centrais 5, 6 e 7, com pH 9 e temperatura de 50 °C, apresentaram  $V_{0\text{ média}} = 10,9$  %GH/h, valor 4 vezes maior do que o experimento 2. Analisando estatisticamente os resultados de DH obtidos após 6h de hidrólise, obteve-se comportamento parecido em todas as enzimas.

A Figura 15 mostra os gráficos de Pareto das enzimas Savinase 16L e 12T. A Figura 16, por sua vez, mostra os gráficos de Pareto das enzimas Alcalase 2.5L e 3.0T.

Figura 14: Gráfico de Pareto indicando os efeitos do GH durante a hidrólise de mucosa suína utilizando as enzimas Savinase 16L (a esquerda) e 12T (a direita) ( $p = 0,05$ ) referente ao planejamento experimental da

Tabela 5.

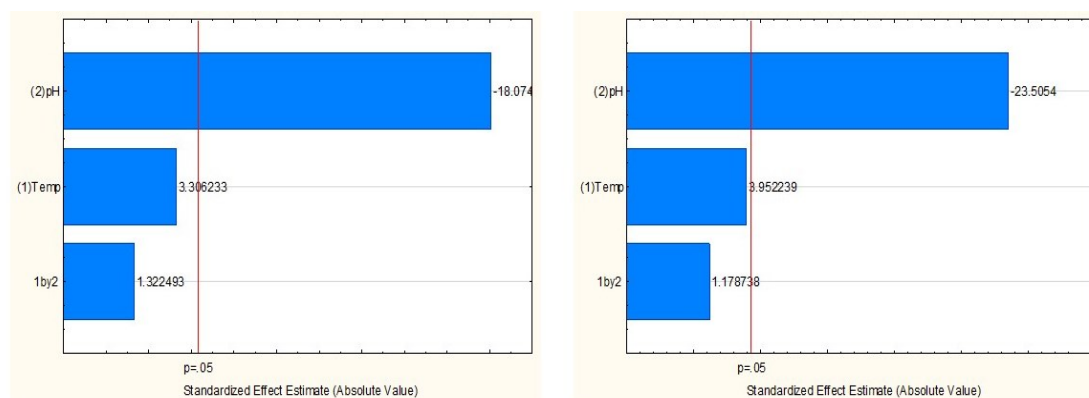
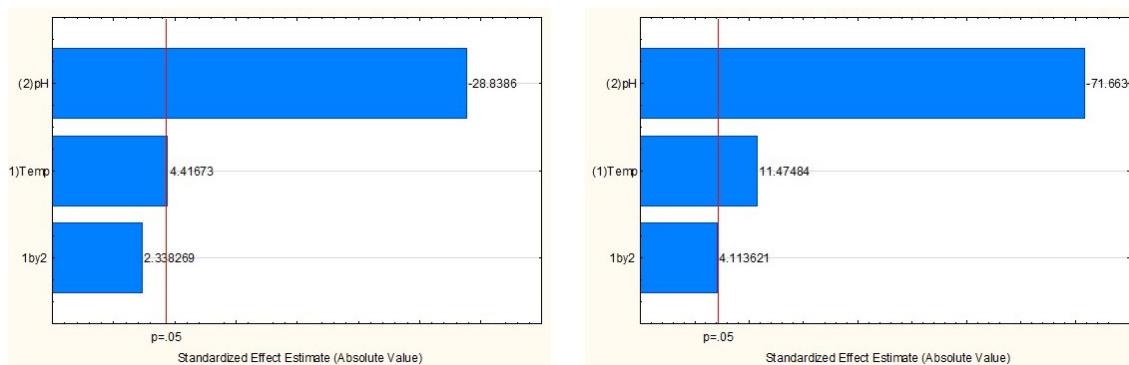


Figura 15: Gráfico de Pareto indicando os efeitos do GH avaliados durante a hidrólise de mucosa suína utilizando a Alcalase 2.5L (a esquerda) e 3.0T (a direita) ( $p= 0,05$ ) referente ao planejamento experimental da Tabela 5.



Aplicando a análise com erro puro, o pH apresentou influência significativa nos resultados de todas as amostras. Já a temperatura teve sua influência validada apenas na amostra produzida com Alcalase.

Analisando apenas o nível evidenciado em cada gráfico de Pareto observa-se que o pH, em seu nível inferior de 8, foi o fator que apresentou mais influência. Já a temperatura indica um melhor desempenho em seu nível superior, de 60 °C. O meio de reação com pH próximo da neutralidade ofereceu condições de hidrólise favoráveis para ambas as enzimas, a presença de  $H^+$  e  $OH^-$  em quantidades equilibradas parecem facilitar a reação. Já a temperatura, em seu maior valor possível de ser aplicado com essas enzimas, garante a agitação molecular necessária para a hidrólise. A interação dos dois fatores, pH e temperatura, observou-se uma sutil influência apenas na Alcalase 3.0T.

Os resultados de GH apresentaram valores mais altos nos pontos centrais. Embora a estatística indique melhor resposta para o nível inferior do pH, possivelmente a combinação com a temperatura um pouco elevada favoreceu a hidrólise e produziu mais rupturas das moléculas nas amostras com pH 9 e temperatura de 50°C.

Com os resultados estatísticos e os valores de GH obtidos, foram fixadas as seguintes condições de processo para todas as enzimas: pH 9 e temperatura de 50 °C, dando maior relevância aos valores de GH obtidos.

Em um meio reacional para hidrólise enzimática, a facilidade de interação substrato-enzima é relevante para definir a velocidade e eficiência do processo. A não adição de água torna o meio mais concentrado, podendo resultar em uma maior



velocidade inicial de hidrólise. No entanto, devido à alta viscosidade do meio, a interação enzima-substrato é dificultada uma vez que a agitação magnética não se mostrou suficiente para manter a homogeneidade do meio. Por isso avaliou-se a quantidade de água a ser adicionada ao meio aplicando-se um planejamento experimental, variando a concentração de substrato através da adição de água, conforme a Tabela 8 mostra. Junto disso, avaliou-se a variação da concentração de enzima.

Tabela 2: Valores de GH obtidos na execução do planejamento experimental da Tabela 7 para cada enzima estudada no tempo de 6h de hidrólise.

Ensaio	Enzima (%)	Substrato (%)	Grau de hidrólise (%)			
			Savinase 16L	Savinase 12T	Alcalase 2.5L	Alcalase 3.0T
1	-1 (0,1)	-1 (40)	10,6	8,2	9,0	7,9
2	-1 (0,1)	1 (80)	17,6	15,4	16,1	15,0
3	1 (0,8)	-1 (40)	12,3	11,7	12,0	11,4
4	1 (0,8)	1 (80)	24,7	23,2	23,8	22,9
5	0 (0,45)	0 (60)	19,4	12,6	16,2	12,3
6	0 (0,45)	0 (60)	21,1	13,2	16,8	13,2
7	0 (0,45)	0 (60)	22,0	12,7	17,0	12,3

Testes realizados com pH 10,0 e temperatura de 50 °C.

De acordo com a Tabela 8 o maior GH obtido, em torno de 25%, foi obtido no ensaio 4, com maior quantidade de enzima e menor de água adicionada. Já a condição que apresentou menor hidrólise (7,9%), possuía menor concentração de enzima e de substrato na solução (ensaio 1).

Para facilitar a visualização do efeito das variáveis no GH obtido, foi construído um gráfico de Pareto, que mostra quais foram os fatores significativos. A Figura 17 mostra os gráficos de Pareto obtidos para a Savinase, enquanto a Figura 18 mostra os obtidos para a Alcalase. Os resultados do planejamento fatorial, com triplicata do ponto central, foram tratados estatisticamente com confiança de 95%.

Figura 16: Gráfico de Pareto indicando os efeitos significativos dos parâmetros avaliados durante a hidrólise de mucosa suína utilizando a Savinase 16L (a esquerda) e 12T (a direita) ( $p= 0,05$ ) referente ao planejamento experimental da Tabela 7.

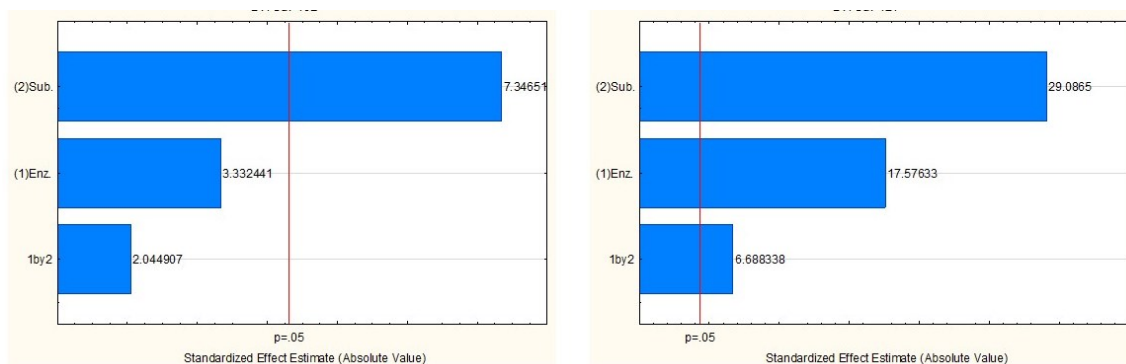
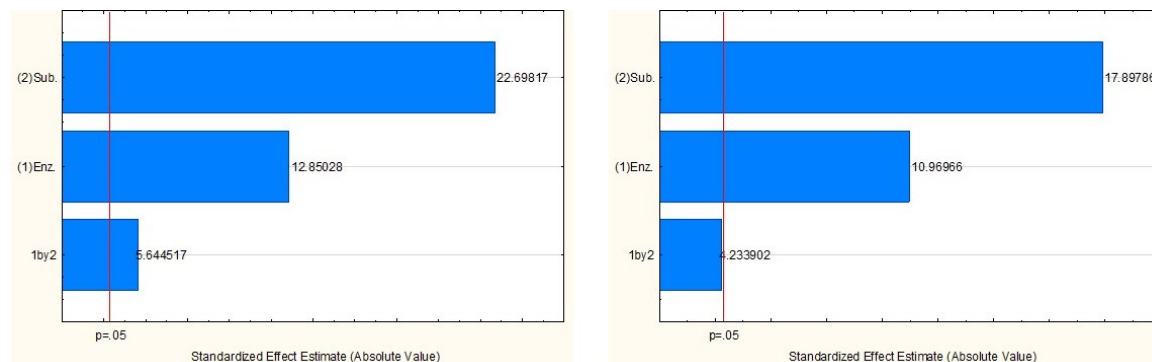


Figura 17: Gráfico de Pareto indicando os efeitos significativos dos parâmetros avaliados durante a hidrólise de mucosa suína utilizando a Alcalase 2.5L (a esquerda) e 3.0T (a direita) ( $p= 0,05$ ) referente ao planejamento experimental da Tabela 7.



Verifica-se que quase todas as variáveis estudadas apresentaram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre o GH em todas as amostras. O efeito estimado indica o quanto cada fator influenciou na resposta estudada, pois quanto maior o seu valor, maior é a sua influência. As enzimas apresentaram influência no nível superior em todas as concentrações de substrato estudadas, quanto maior a quantidade de mucosa suína presente no caldo de hidrólise, maior o GH obtido. Este resultado era esperado, tendo em vista que quanto mais moléculas de proteína estiverem disponíveis para reação, maior será a atuação da enzima em um determinado tempo.

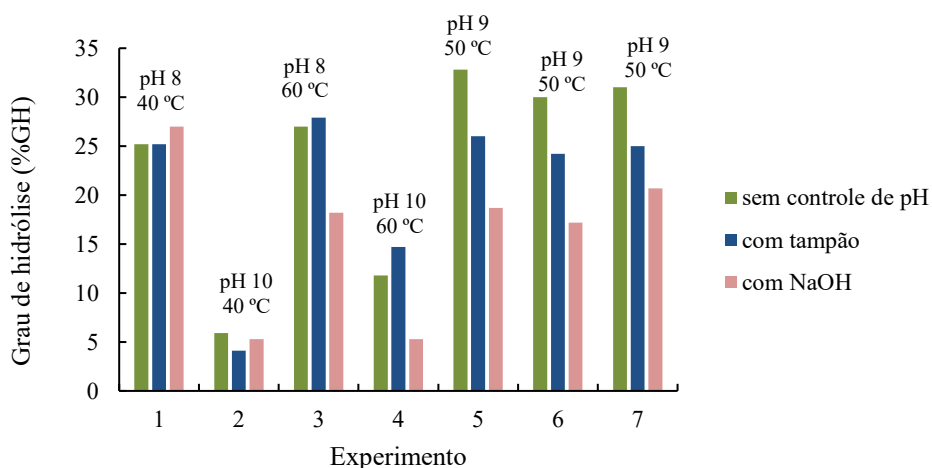
Quanto à concentração de enzima, três das enzimas estudadas apresentaram efeito positivo no seu nível mais alto, mostrando que amostras com maior quantidade de

enzima desenvolveram GH maiores, possivelmente pela maior disponibilidade destas para reação com o substrato.

Apenas a enzima Savinase 16L não apresentou influência significativa ( $p < 0,05$ ) da concentração de enzima no GH. As concentrações escolhidas apresentaram quantidades de enzima suficientes para hidrolisar o substrato presente no caldo de forma a se obter um GH próximo ao obtido em concentrações mais altas de enzima. Assim, é mais vantajoso utilizar o nível de concentração mais baixo.

O pH do caldo variou durante a hidrólise, estabilizando em torno de 7,5 em todos os experimentos - logo, questionou-se sobre a influência dessa variação no comportamento da enzima. Três propostas foram utilizadas para controlar o pH na reação: i) ajustar o pH inicialmente e deixar que as variações ocorram livremente ao longo do processo, ii) controlar o pH substituindo os 20% de água adicionada por 20% de uma solução tampão e, iii) controlar o pH adicionando diretamente no meio reacional NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A Figura 19 mostra a variação no grau de hidrólise obtido com as diferentes formas utilizadas de controle do pH.

Figura 18: Comparativo entre as 3 formas de ajuste de pH testadas: sem controle de pH ( $pH_0=10$ ), com adição de solução tampão e com adição continuada de solução de NaOH 0,1M. Sendo os experimentos 5, 6 e 7 os pontos centrais.

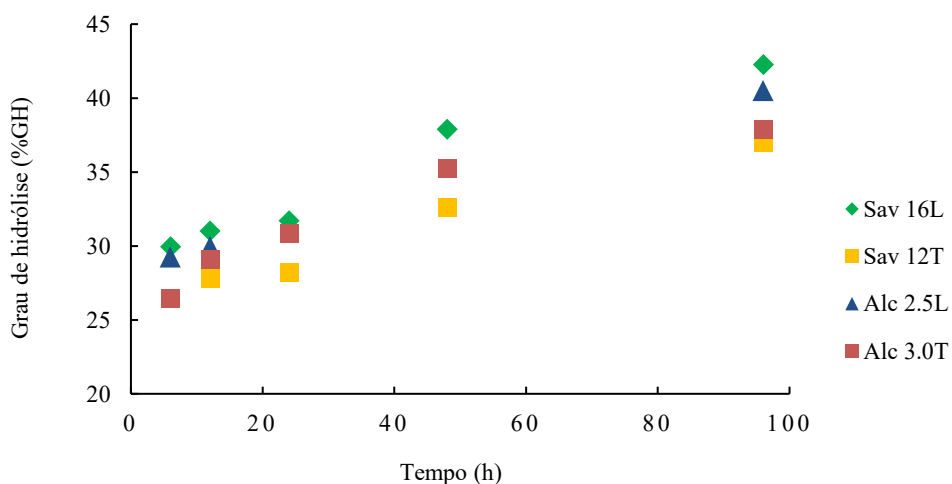


De acordo com a Figura 19, pode-se observar que o melhor desempenho da enzima, na maioria dos experimentos, foi para os ensaios sem controle de pH. O teste com solução tampão apresentou melhor desempenho somente no ponto 3 e 4. Na triplicata do ponto central, o teste no qual o pH foi definido apenas no início do experimento,

deixando que variasse livremente ao longo do tempo de hidrólise, apresentou desempenho superior aos demais, reforçando a condição de pH 10 e temperatura de 50 °C como mais adequados para a reação. Alguns pesquisadores também optam por ajustar o pH inicial apenas (ZANG *et al.*, 2013; TOIDA; LINHARDT, 1996; VLODAVSKY; SANDERSON; ILAN, 2020), assim se diminui a adição de sais no caldo hidrolisado e embora se adiciona NaCl para o ajuste inicial, a quantidade é pequena e em um futuro escalonamento do processo, a não adição de tampão facilitaria a etapa. Baseado nestes resultados, optou-se por manter a hidrólise sem controle de pH durante a reação, sendo somente regulado no início do processo.

Outra condição estudada foi o tempo de hidrólise. Mantendo o pH inicial 9 e 50 °C, estendeu-se o tempo de hidrólise até 96 horas, visando observar o comportamento da reação. A Figura 20 mostra a evolução do GH das enzimas estudadas ao longo de 96 h de hidrólise.

Figura 19: Evolução do GH das enzimas estudadas ao longo de 96h de hidrólise.



Todas as enzimas apresentaram comportamento similar. De acordo com a Figura 20, o grau de hidrólise da amostra aumentou gradativamente com o tempo de hidrólise. O meio de reação, por sua vez, tornou-se menos viscoso à medida que a reação de hidrólise avançou no tempo, comportamento esperado uma vez que os processos de hidrólise clivam cadeias longas, interferindo na viscosidade do meio. Este fato pode ter contribuído para o contínuo aumento do GH, visto que, mesmo reduzindo a concentração

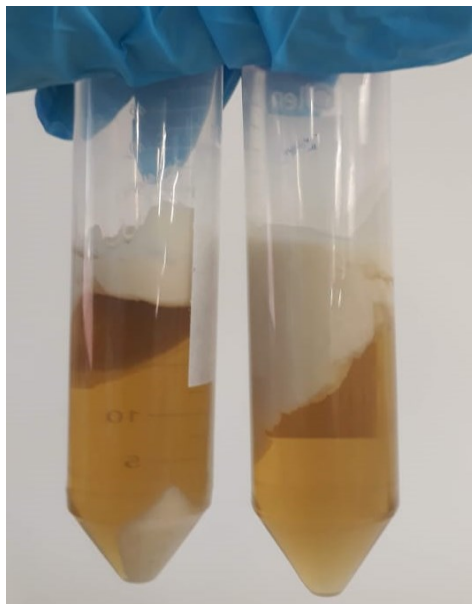
de substrato disponível para reação, a facilidade de contato da enzima com esse substrato elevou-se, permitindo acréscimo nas ligações rompidas.

Em todos os tempos analisados, a enzima que apresentou maior GH foi a Savinase 16L, mantendo-se em elevação mesmo após 96 h. Optou-se por parar o processo após esse período por se entender ser um tempo longo o suficiente para analisarmos a continuidade da ação enzimática e por ter ultrapassado os tempos de estudos mais habituais, cuja maioria é de até 24 h.

#### 4.4 ANÁLISE DO PRODUTO DE HIDRÓLISE POR ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO - NIR

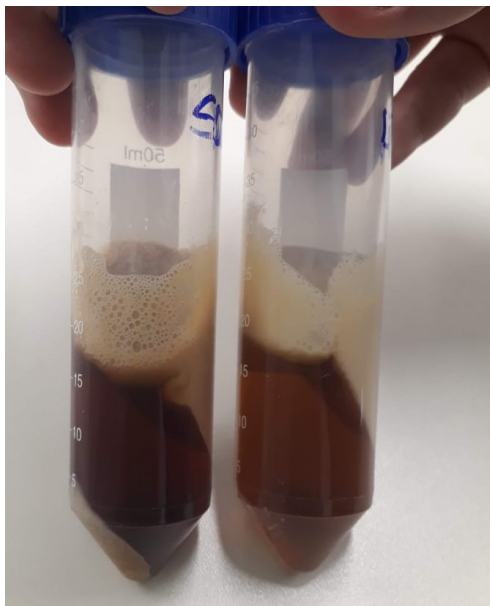
Com o processo de hidrólise finalizado, o caldo hidrolisado a 50 °C, pH inicial 9, 0,1% m/m (em relação a proteína da mucosa em B.S.) de enzima e 80% de concentração de substrato, foi submetido à centrifugação por 20 minutos a 5600 g em uma centrífuga SL-700 Solab (Piracicaba, São Paulo) visando à remoção da fração lipídica e dos sólidos insolúveis no meio. Posteriormente à centrifugação, as enzimas líquidas Savinase 16L e Alcalase 2.5L apresentaram duas fases, enquanto as enzimas sólidas apresentaram 3 fases, como é possível visualizar nas Figuras 21 e 22.

Figura 20: Fotografia dos caldos hidrolisados por 12h, seguido de centrifugação.



Alcalase 3.0T (esq) e Alcalase 2.5L (dir)

Figura 21: Fotografia dos caldos hidrolisados por 12h, seguido de centrifugação.



Savinase 12T (esq) e Savinase16L (dir)

A fase líquida foi separada das demais e submetida à permeação com papel filtro e posteriormente, microfiltrada em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . Obteve-se assim, um líquido translúcido, o qual foi analisado em espectrômetro de infravermelho próximo, pois este é capaz de distinguir diferenças na composição química das misturas sem praticamente nenhuma preparação da amostra. As Figuras 23 e 24 mostram os espectros obtidos com as amostras hidrolisadas com Savinase®.

Figura 22: Espectros NIR comparando a heparina médica com a amostra hidrolisada por 96h da Savinase 16L 0,1%, 50°C, pH 9 e da Savinase 12T 0,1%, 50°C, pH 9.

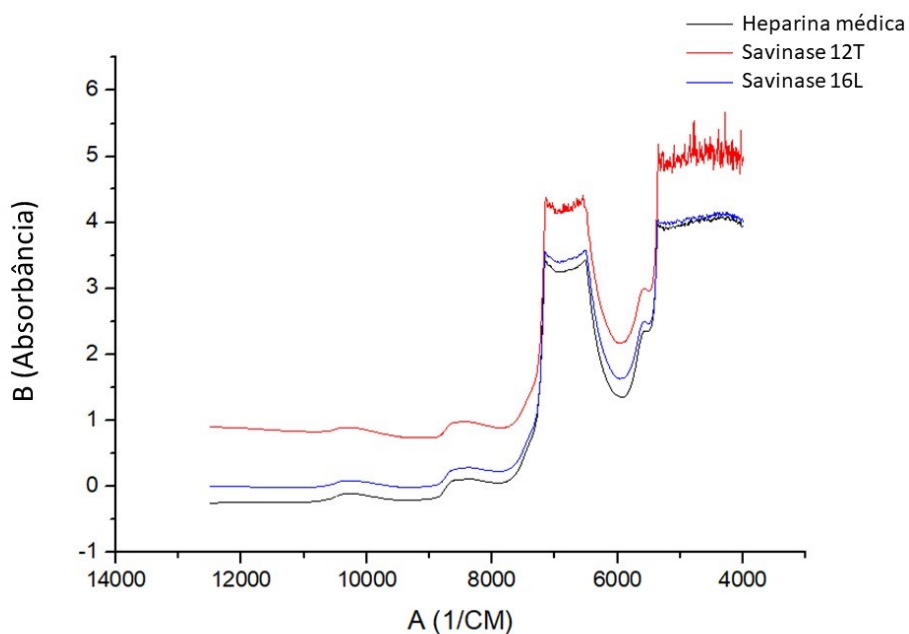
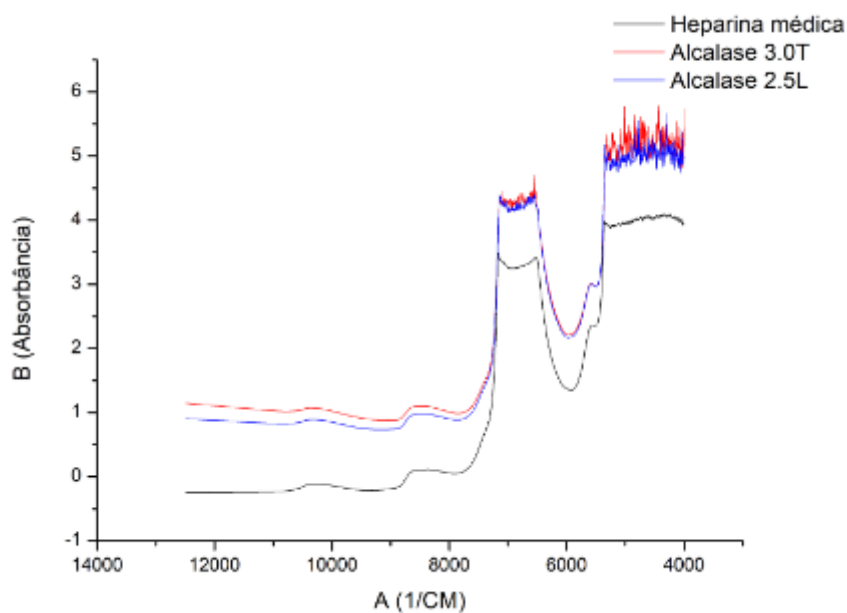


Figura 23: Espectros NIR comparando a heparina médica com a amostra hidrolisada por 96h da Alcalase 3.0T a 0,1%, 50°C, pH 9 e da Alcalase 2.5L 0,1%, 50°C, pH 9.



De acordo com as Figuras 23 e 24, as enzimas Savinase 16L e Alcalase 2.5L apresentaram curva mais próxima à heparina médica, utilizada como padrão nessa análise, do que a demais enzimas, que apresentaram ruídos em toda curvatura.

A heparina exibe uma banda de absorção entre 4000 e 4700 $\text{cm}^{-1}$  e outra entre em 6500 e 7500 $\text{cm}^{-1}$  o que caracteriza essa molécula como heparina, diferindo-a do sulfato de dermatano, que apresenta apenas a segunda banda de absorção, como também foi verificado por Spencer *et al.* (2009). O sulfato de condroitina, outro contaminante, possui dois pequenos picos na região em torno de 4730 $\text{cm}^{-1}$ , outro pico em 5800 $\text{cm}^{-1}$  e um terceiro pico em 7000 $\text{cm}^{-1}$ . Espera-se que a presença desse como contaminante na heparina mude o pico de heparina em 6900 $\text{cm}^{-1}$  para uma energia mais alta, o que pode explicar a diferença obtida na curva com Savinase 12T e Alcalase 3.0T. A forma como essas enzimas hidrolisam o substrato pode ter permitido a liberação desse composto no meio. Entretanto, devido à sobreposição dos espectros NIR, não é possível afirmar se a amostra está livre desse contaminante.

Os resultados obtidos no espectrômetro NIR mostraram correspondência com os obtidos por Zang *et al.* (2013), que desenvolveram um método para o monitoramento em tempo real da concentração de heparina no processo de cromatografia. Considerando que o processo apresentado por Zang *et al.* (2013) iniciou com uma heparina bruta comercial, que já sofreu processo de hidrólise no seu preparo, pode-se considerar que a similaridade com os resultados mostrados nas Figuras 23 e 24 direcionam para a efetividade das enzimas Savinase 16L e Alcalase 2.5L aplicados nessa pesquisa.

Em processos convencionais, a heparina bruta é obtida como primeiro produto, e só depois passa por novos processos para se chegar nas heparinas fracionadas comerciais. Por essa razão, o tempo de processamento de 96 h, superior aos valores geralmente encontrados na literatura para hidrólise de glicosaminoglicanos (DIETRICH SEIDEL, GÖTTINGEN; WOLFGANG FELLER, MELSUNGEN; GERHARD ROSSKOPF, 1990; FLENGSRUD; ODEGAARD, 2005), pode ter resultado em uma liberação de heparina aproximada a heparina comercial.

#### 4.5 FRACIONAMENTO DO CALDO OBTIDO POR PERMEAÇÃO POR MEMBRANA

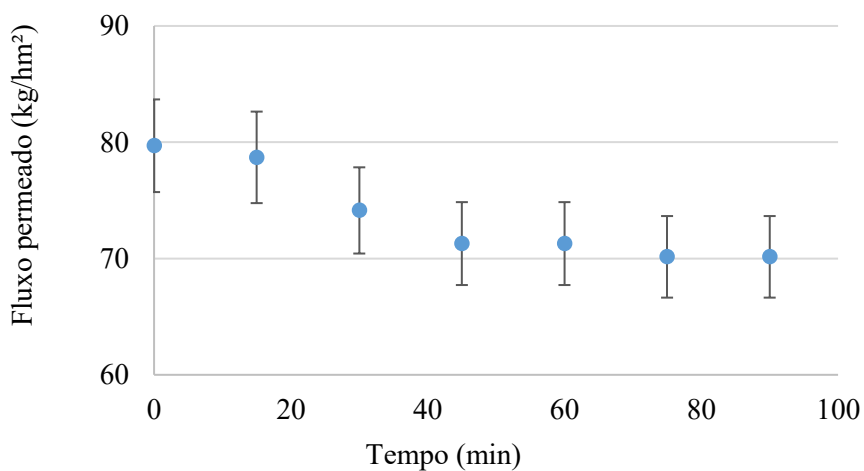
Ao final do período de hidrólise, o caldo hidrolisado foi centrifugado para a separação da fase leve (gordura) e da fase pesada (particulados não reagidos). Nessa etapa de separação,  $46\pm 7\%$  da massa total centrifugada era retirada na fase líquida. O caldo



obtido passava por filtro qualitativo ( $28\mu\text{m}$ ), resultando em uma perda de  $12\pm 3\%$  da massa inicial. Já o permeado era novamente filtrado em membrana de microfiltração ( $0,2\mu\text{m}$ ) com o objetivo de clarificar e reter as partículas ainda presentes. Após essas etapas de pré-tratamento do caldo hidrolisado, este era direcionado para a etapa de fracionamento com a membrana de UF (5kDa).

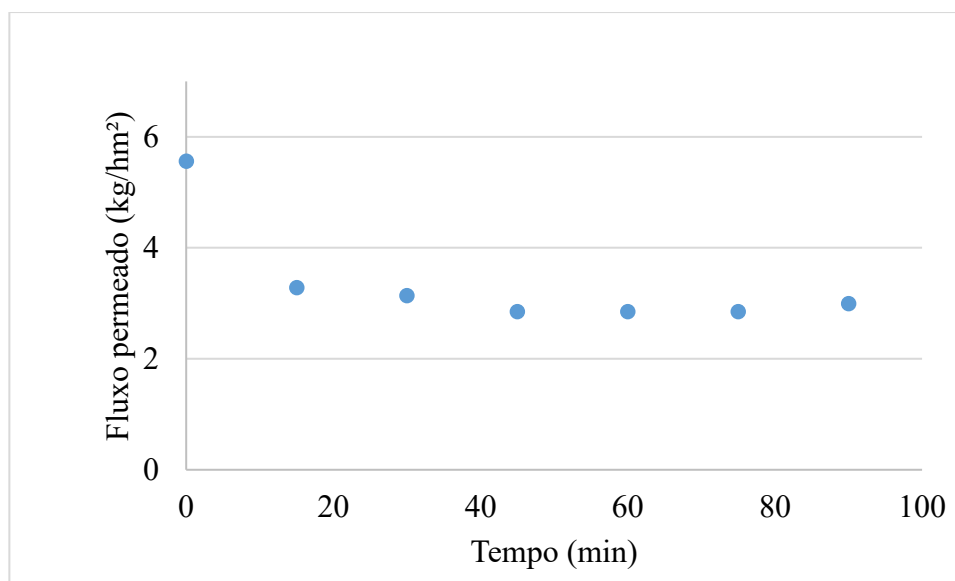
Para garantir a compactação da membrana, um estudo do fluxo de permeado foi estabelecido, até a obtenção de fluxo constante. A Figura 25 mostra o gráfico obtido.

Figura 24: Fluxo de água da membrana UH004, com pressão de 3bar e temperatura ambiente de  $21^\circ\text{C}$ .  
Valores obtidos em triplicata.



Após 45min observa-se a estabilização do fluxo, o que indica a compactação da membrana. Assim, para os demais testes com membrana, foi estabelecido o tempo de compactação de 45min. A Figura 26 mostra o comportamento do fluxo permeado ao longo do tempo de permeação de caldo hidrolisado.

Figura 25: Fluxo de permeado do caldo hidrolisado.



Pode-se visualizar que o fluxo permeado apresenta uma queda expressiva nos primeiros 15 minutos, provavelmente devido a formação de uma camada de *fouling* que ficou estável ao longo do processo, fenômeno característico em processos de permeação com membranas. Apesar desta queda abrupta no início da permeação, o fluxo permeado manteve-se constante durante os 75 minutos seguintes.

Ainda não se têm estudos de permeação de caldo hidrolisado de heparina em membranas na literatura. Assim, para entender melhor o comportamento da solução, fez-se o cálculo da normalização do fluxo obtido. Observa-se que após 90 min de permeação, o fluxo se mantém em torno de 50% do valor inicial. Apesar da queda abrupta inicial, o fluxo não decai rapidamente no período de filtração, o que é um bom indicio para o uso de membranas para purificação desse caldo hidrolisado.

Após a ultrafiltração, buscou-se analisar o caldo permeado e retido pela membrana para entender se a heparina estava presente nas frações e quais as características dessa heparina obtida.

Para facilitar o armazenamento e transporte das amostras, todas foram liofilizadas e armazenadas a -18°C.

#### 4.6 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (ATR-FTIR)

DEVLIN *et al.*, (2019) demonstrou como o FTIR poderia ser usado para relacionar as bandas encontradas em amostras de heparina bruta com amostras reais de heparina e concluiu que essa análise poderia ser usada para caracterizar heparinas brutas com base em heparinas brutas conhecidas. Da mesma forma, este pode também ser usado para estabelecer as características estruturais dos compostos analisados com base em constituintes de bibliotecas. Neste sentido, buscando determinar mais precisamente qual a composição obtida nas amostras produzidas descritas no item 3.5 (amostra com resina, caldo hidrolisado pré-tratado, permeado e retido), estas foram analisadas por ATR-FTIR.

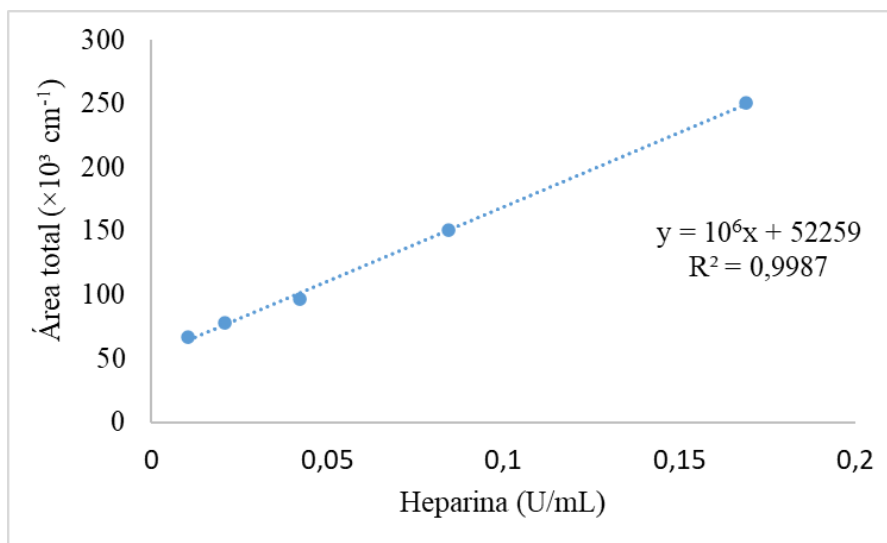
Para estimar a quantidade de heparina presente em cada amostra estabeleceu-se uma curva padrão com cinco diferentes concentrações do padrão de heparina contendo 180U/mg. As concentrações utilizadas e os valores das áreas de pico obtidas, calculadas pelo software *IRsolution* estão descritos na Tabela 9.

Tabela 3: Concentrações e áreas de pico obtidas para a elaboração da curva de calibração de ATR-FTIR.

	concentração (mg/mL)	U/mL	área 1630 cm <sup>-1</sup>	área 3300 cm <sup>-1</sup>	área total (cm <sup>-1</sup> )
padrão	0,01500	2,7	38013	508546	546559
S1	0,00094	0,16875	29786	220626	250412
S2	0,00047	0,08437	28679	122583	151262
S3	0,00023	0,04219	27811	69250	97061
S4	0,00012	0,02109	26755	51233	77988
S5	0,00006	0,01055	26651	40467	67118

Com esses dados, a curva padrão foi estabelecida somando as áreas dos dois picos indicados na tabela 9. A Figura 27 mostra a curva obtida.

Figura 26: Curva padrão para a análise de ATR-FTIR.

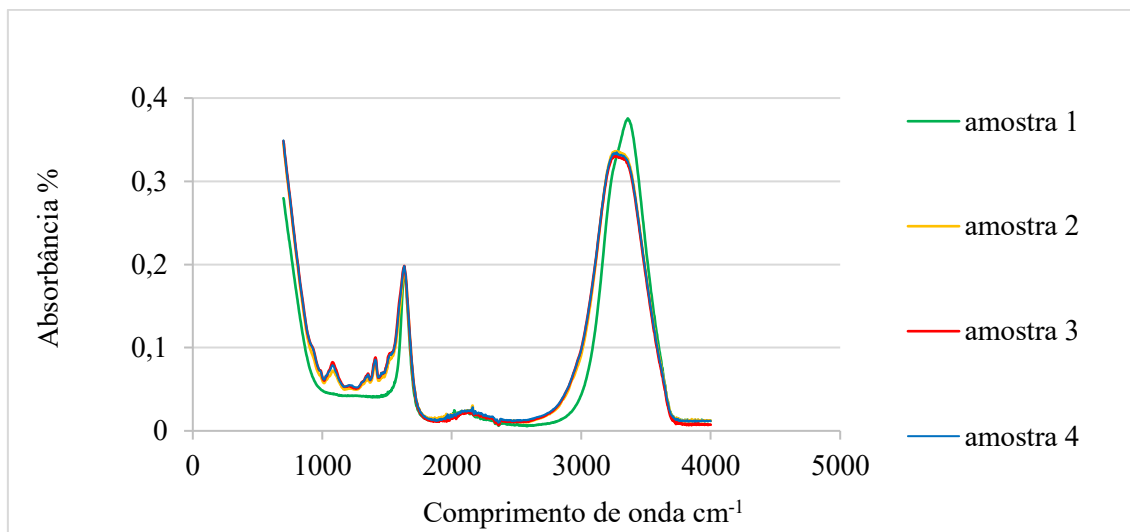


A análise das bandas agrupadas para a quantificação relativa da heparina presente nos produtos obtidos se justifica pelo fato de que muitas bandas características se sobrepõem no espectro, o que impossibilita a identificação de cada uma separadamente (Harada *et al.*, 2005). E, considerando que as amostras passaram apenas por processo de separação por massa molar, os espectros aqui apresentados são uma mistura dessas moléculas de heparina com outras substâncias presentes no material inicial e que possuam tamanho semelhante a heparina. A Figura 28 mostra os espectros obtidos para cada amostra.

Como descrito no item 3.5, as amostras citadas são:

- Amostra 1: amostra comparativa obtida por processo industrial convencional sugerido pela Purolite, item 3.3
- Amostra 2: caldo hidrolisado obtido após pré-tratamento com filtro qualitativo e permeado em membrana MV020
- Amostra 3: fração do caldo hidrolisado permeada após permeação em membrana de ultrafiltração UH004
- Amostra 4: fração do caldo hidrolisado retida após permeação em membrana de ultrafiltração UH004

Figura 27: Espectros ATR-FTIR das amostras estudadas, cuja características são descritas pelo item 3.8.



O espectro IR obtido apresenta dois picos principais em  $1630$  e  $3300\text{ cm}^{-1}$  que correspondem a vibrações de alongamento dos grupos NAc e OH (TIPSON, 1968) respectivamente, e o pico em  $1100\text{ cm}^{-1}$  provavelmente resulta do estiramento C-O de carboidratos característicos e flexão C-O-H (ORR, S. F. D, 1954). Um pico semelhante em  $1120\text{ cm}^{-1}$  para estiramento de S=O foi observado no espectro IR da unidade glicosaminoglicana da heparina (LONGAS; BREITWEISER, 1991) e observado nos espectros aqui relatados, podendo indicar uma sobreposição dessas ligações características. Com esses espectros observamos picos característicos da molécula de heparina, embora o agrupamento desses picos não permita a identificação exata de cada estrutura característica individualmente, a presença destes já é um forte indício da presença de heparina nas amostras.

Da mesma forma, as amostras foram submetidas à análise e fez-se a soma das áreas dos dois picos de interesse.

Os espectros obtidos foram tratados pelo software *IRsolution*, presente no equipamento de análise. Na Tabela 11, as áreas dos picos de interesse são apresentadas.

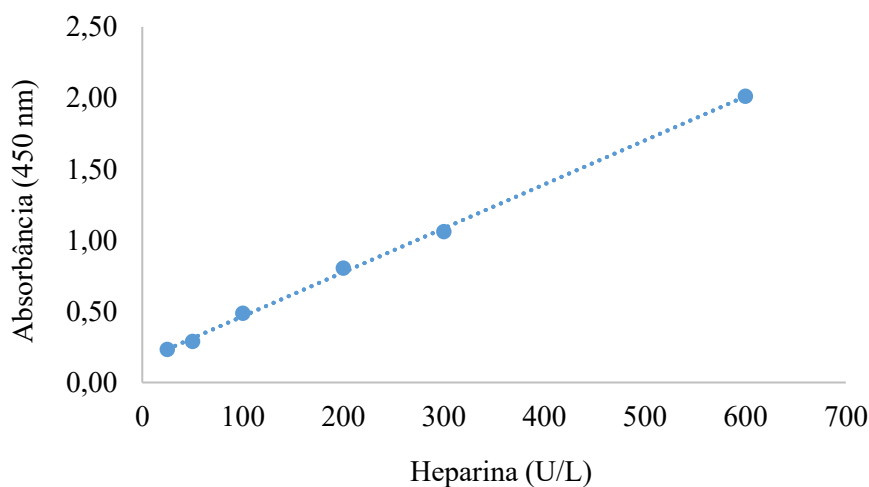
Tabela 4: Áreas obtidas nos pontos de interesse através de integração pelo software IRsolution e cálculo de estimativa de concentração de heparina das amostras estudadas.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
área 1100 $\text{cm}^{-1}$	0	2015,4	1604,12	1748,4
área 1417 $\text{cm}^{-1}$	0	654,3	548,2	569,1
área 1550 $\text{cm}^{-1}$	0	352,6	398,2	321,4
área 1630 $\text{cm}^{-1}$	26701,3	25651	23046	21521,9
área 3300 $\text{cm}^{-1}$	67452,2	41289,6	40253	40244,8
área total ( $\text{cm}^{-1}$ )	94153,5	69963,1	65849,92	64405,6
U/g (pela equação da reta)	0,036	0,015	0,012	0,010
Concentração da amostra inicial (g/mL)	0,05	0,2	0,1	0,05
U/g	0,72	0,08	0,12	0,21

#### 4.7 ANÁLISE POR KIT *PORCINE HEPARIN ELISA*

Com o kit *Porcine Heparin ELISA* é possível quantificar a heparina presente nas amostras relativamente ao padrão fornecido. Para a curva padrão foram testadas seis concentrações diferentes, entre 0 e 600 U/L. Com os dados obtidos, elaborou-se a curva padrão de concentração exibida na Figura 29.

Figura 28: Curva padrão de concentrações para o KIT *Heparin porcine*,



Aplicando a equação da curva padrão estabelecida ( $y = 0,0031x + 0,1565$ ) foi possível obter os valores de heparina em (U/L) presente em cada amostra estudada, cujas características são descritas no item 3.8. A Tabela 12 mostra as concentrações de heparina obtidas através da aplicação da equação fornecida pela curva padrão.

Tabela 5: Concentrações de heparina obtidas através de análise com o KIT *Porcine Heparin ELISA*.

Amostra	Abs 450 nm	Conc. obtida pela curva padrão (U/L)	Conc. inicial da amostra em solução aquosa (g/L)	Conc. de heparina na amostra em (U/g)
1-amostra comparativa obtida por processo industrial convencional sugerido pela Purolite, item 3.3	0,63±0,02	151,13	200	<b>0,76</b>
2-caldo hidrolisado obtido após pré-tratamento com filtro qualitativo e permeado em membrana MV020	0,17±0,01	4,68	50	<b>0,11</b>
3-fração do caldo hidrolisado permeada após permeação em membrana de ultrafiltração UH004	0,22±0,01	20,97	200	<b>0,10</b>
4-Fração do caldo hidrolisado retida após permeação em membrana de ultrafiltração UH004	0,18±0,01	9,03	50	<b>0,18</b>

Pode-se observar a presença de heparina em todas as amostras estudadas. Essa identificação mostra que ocorreu a liberação da heparina ligada à mucosa suína para o meio após o processo hidrolítico.

Assim, a ideia de liberar heparina apenas com a hidrólise enzimática se mostrou possível. Embora essa liberação possa não estar ocorrendo com 100% da heparina presente na amostra, visto que a amostra 1, produzida com hidrólise alcalina e uso de resina, apresentou uma concentração final quatro vezes maior do que a amostra 2, produzida com hidrólise enzimática, ficando entre 0,76U/g para 0,11U/g, respectivamente. Se considerarmos que o método de produção utilizado para a amostra 1 têm eficiência bastante conhecida e discutida (MEER; KELLENBACH; BOS, 2017), pode-se entender que havia mais heparina a ser liberada na amostra 2, o que elucida a necessidade de aprimoramento do método.

A amostra 3, fração permeada pela membrana, também apresenta uma quantidade de heparina que provavelmente se trata de heparinas de baixa massa molar, visto que a membrana utilizada nos ensaios de fracionamento apresentava massa de corte de 5kDa. Essa faixa molar apresenta propriedades biológicas e químicas definidas, uma melhor biodisponibilidade, um índice terapêutico mais alto e com menos efeitos colaterais (BOLTEN; RINAS; SCHEPER, 2018).

#### 4.8 ANÁLISE POR KIT *FACTOR XA ACTIVITY FLUOROMETRIC ASSAY*

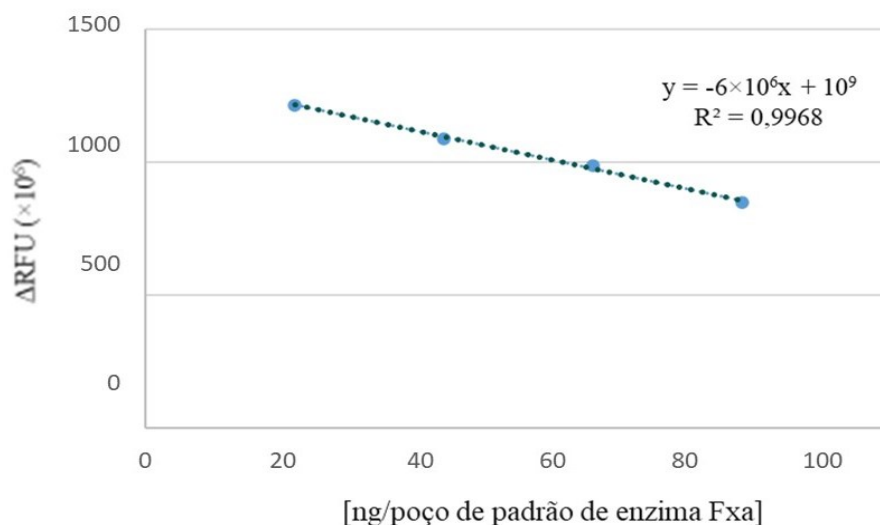
Pensando na atividade da heparina obtida, analisou-se as amostras com um segundo KIT de detecção de fator Xa. Uma curva padrão ao longo do tempo foi desenvolvida para relacionar as leituras obtidas e tempo necessário para obtê-las. A Tabela 13 mostra as leituras no tempo inicial (RFU (0min)) e final (RFU (60min)) e o  $\Delta$ RFU utilizados para a elaboração da curva padrão.

Tabela 6: Valores no tempo inicial (RFU (0min)) e final (RFU (60min)) e o  $\Delta$ RFU em cada concentração conhecida utilizados para a elaboração da curva padrão.

[ng/poço de padrão de enzima Fxa]	RFU (0min)	RFU (60min)	$\Delta$ RFU (0-60)
0	62312607	66530809	4218202
20	334579312	1,548E+09	1213631312
40	488069920	1,577E+09	1088619232
60	563812800	1,551E+09	986867392
80	723202944	1,571E+09	847864640

Com os dados mostrados pela Tabela 13, obteve-se a curva apresentada na Figura 30. Como o primeiro poço não possuía nenhuma quantidade de substrato para ser digerida, sendo mantido apenas como ponto 0, a curva foi desenhada com os poços que possuíam alguma concentração de substrato para degradação.



Figura 29: Curva padrão para o KIT *Factor XA Activity Fluorometric Assay*.

Observa-se que a curva apresenta um declínio ao longo do tempo, fato esse esperado visto que esse KIT busca identificar a heparina ativa através da inativação do fator Xa. Espera-se que conforme o tempo de análise avance, a quantidade de fator Xa não ligado diminua, diminuindo assim a intensidade do sinal fluorométrico.

As amostras em análise, juntamente com o padrão de heparina (Sigma Aldrich), foram submetidas ao KIT e os resultados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 7: Valores de fluorescência e resultados do KIT.

Amostra	Fluorescência	Curva padrão [ng/poço de padrão de enzima Fxa]	Fxa (ug/L)
<b>padrão</b>	34193	1,52	3
<b>1</b>	1574712	69,95	140
<b>2</b>	1898798	68,97	69
<b>3</b>	2328224	67,67	136
<b>4</b>	1925330	68,89	34

A heparina inativa o fator de coagulação Xa, então se há heparina ativa na amostra, a quantidade de FXa identificado irá diminuir conforme a quantidade de

heparina ativa presente. Isso fica claro quando se compara a resposta obtida com o padrão de heparina (padrão comercial para análises fluorométricas Sygma Aldrich, Alemanha) as demais amostras.

O padrão apresentou uma maior inativação do FXa provavelmente devido à maior concentração e pureza da heparina presente nele, visto que é um padrão com apenas 0,07% de contaminantes. Enquanto entre as amostras produzidas por esse estudo, a amostra 1 e 3 apresentaram valores similares e elevados, o que indica que, mesmo a heparina estando presente, como indicado pela análise com o KIT *Porcine Heparin ELISA* e FTIR, essas moléculas provavelmente não estão ativadas, não conseguem assim inativar o fator Xa que inicia o processo de coagulação sanguínea. Ambas as amostras podem possuir heparina com massa molar elevada, acima de 5 kDa, tendo seus sítios de inativação do fator Xa bloqueados por outras ramificações da molécula, gerando menor resposta quando expostos a esse KIT.

Já nas amostras 2 e 4, a concentração do fator Xa foi um pouco menor o que nas amostras 1 e 3. Podemos entender que as moléculas de heparina com atividade anticoagulante presentes na amostra 2 foram permeadas pela membrana e se concentraram na amostra 4, resultando em uma concentração de fator Xa menor na amostra 4. Assim, a concentração de Fator Xa presente em cada amostra dá indícios de algumas características da heparina presente em cada amostra.

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho buscou explorar a hidrólise enzimática associada ao uso de membranas como uma via alternativa à produção de heparina. A primeira etapa consistiu na liberação desta no meio reacional seguida pela purificação com a ultrafiltração.

Após as etapas iniciais de purificação, os espectros NIR apresentaram comportamento similar a encontrados em outros estudos, demonstrando resultados promissores.

Os resultados obtidos com a heparina fracionada e com a obtida pela metodologia tradicional mostram que a heparina se fez presente em todas as amostras, com particularidades em cada uma, como a maior concentração de moléculas que inativam o fator Xa na fração permeada pela membrana, o que indica maior poder anticoagulante dessa fase. Enquanto que a presença de heparina na fração retida provavelmente é composta por heparinas com maior massa molar, que costumam apresentar menor atividade anticoagulante.

A utilização dos KITS aparece como uma alternativa para facilitar essa caracterização. A aplicação da técnica de detecção por ATR-FTIR, ao invés de técnicas mais caras e complexas como a cromatografia, se apresenta também como um facilitador na identificação da heparina no caldo inicial.

O processo de produção de heparina não é uma área fortemente explorada pela pesquisa científica, por isso alterar etapas já tão consolidadas industrialmente é um desafio, ainda mais por se tratar de uma substância bastante complexa. A continuidade deste estudo possibilitará entender quais compostos estão presentes nesse caldo, bem como estabelecer métodos de separação eficientes. O entendimento da composição obtida e do grau de liberdade que essas moléculas apresentam possibilitará o posterior estudo da sua purificação e fracionamento e, em seguida, possibilitará o estudo da atividade biológica.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABRÃO, A. **Operações de troca iônica**. [s.l: s.n.].
- ACHOUR, O. *et al.* A strategy for rapid sequencing of heparan sulfate and heparin saccharides. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 163, n. 2, p. 1–19, 2012.
- ACHOUR, O. *et al.* Ultrasonic-assisted preparation of a low molecular weight heparin (LMWH) with anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 684–689, 2013.
- AOAC. **Methods of Analysis**. Michigan: The Association, 1990.
- BAYTAS, S. N.; LINHARDT, R. J. Advances in the preparation and synthesis of heparin and related products. **Drug Discovery Today**. Elsevier Ltd, , 1 dez. 2020.
- BERGAMASCHINI, L. *et al.* Peripheral Treatment with Enoxaparin , a Low Molecular Weight Heparin , Reduces Plaques and Amyloid Accumulation in a Mouse Model of **Alzheimer ' s Disease**. v. 24, n. 17, p. 4181–4186, 2004.
- BHUSHAN, I. *et al.* Heparin depolymerization by immobilized heparinase: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 721–730, 2017.
- BOLTEN, S. N.; RINAS, U.; SCHEPER, T. Heparin: role in protein purification and substitution with animal-component. **Microbiology and Biotechnology**. Springer Verlag, , 1 out. 2018.
- BROOKS, M. B.; STOKOL, T.; CATALFAMO, J. L. Comparative Hemostasis: Animal Models and New Hemostasis Tests. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, n. 1, p. 139–159, 2011.
- CABASSI, F., Casu, B. & Perlin, A. S. Infrared absorption and raman scattering of sulfate groups of heparin and related glycosaminoglycans in aqueous solution. **Carbohydrates Resource** 63, 1–11, 1978.
- CALDWELL, E. E. O. *et al.* Importance of specific amino acids in protein binding sites for heparin and heparan sulfate. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 28, n. 2, p. 203–216, 1996.
- CASU, B.; NAGGI, A.; TORRI, G. Re-visiting the structure of heparin. **Carbohydrate Research**, v. 403, p. 60–68, 2015.
- CASU, B., Scovena, G., Cifonelli, A. & Perlin, A. S. Infrared spectra of glycosaminoglycans in deuterium oxide and deuterium chloride solution: quantitative

evaluation of uronic acid and acetamidodeoxyhexose moieties. **Carbohydr. Res.** 63, 13–27 1978.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1998.

COSMI, B.; PALARETI, G. Old and new heparins. **Thrombosis Research**, v. 129, n. 3, p. 388–391, 2012.

CUI, Z. F.; MURALIDHARA, H. S. Chapter 2 - Challenges of Membrane Technology in the XXI Century, Editor(s): Z.F. Cui, H.S. Muralidhara, Membrane Technology, Butterworth-Heinemann, 2010.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358–363, 2009.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting **New Series**. 1964.

DESAI, U. R. Chapter 17-Antithrombin Activation and Designing Novel Heparin Mimics. In: **Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate**. [s.l.] Elsevier B.V., 2005. p. 483–512.

DEVLIN, A. *et al.* Analysis of solid-state heparin samples by ATR-FTIR spectroscopy. **BioRxiv**. 2019.

DIETRICH SEIDEL, GÖTTINGEN; WOLFGANG FELLER, MELSUNGEN; GERHARD ROSSKOPF, F.-D. **Process and device for the specif adsorption of heparin**, 1990.

FLENGSRUD, R.; ODEGAARD, O. R. **Process for the production of a low molecular weight heparin**, 2005.

FRANCO, R. F. **Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise**. Medicina. **Anais...**2001

FOOT, M. & Mulholland, M. Classification of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine 6 sulfate using chemometric techniques. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 38, 397–407, 2005.

FOSTER, A. B.; HIJGGARD, A. J. **The chemistry of heparin**. 1953.

FROMM, J. R. *et al.* Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 323, n. 2, p. 279–287, 1995.

FU, L. *et al.* Structure and activity of a new low-molecular-weight heparin produced by enzymatic ultrafiltration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1375–1383, 2014.

GIACOBBO, A. **Recuperação de polifenóis e polissacarídeos de efluentes vinícolas através de processos de separação por membranas.** [s.l: s.n.].

GRANT, D., Long, W. F., Moffat, C. F. & Williamson, F. B. Infrared spectroscopy of chemically modified heparins. **Biochemical Journal** 261, 1035–1038, 1989.

GRANT, D., Long, W. F., Moffat, C. F. & Williamson, F. B. Infrared spectroscopy of heparins suggests that the region 750-950 cm<sup>-1</sup> is sensitive to changes in iduronate residue ring conformation. **Biochemical Journal** 275, 193–197, 1991.

GRANT, D., Moffat, C. F., Long, W. F. & Williamson, F. B. N-Sulphonate infrared absorbances of chemically modified heparins. **Biochem. s** 17, 498–500, 1989.

GRANT, D., Long, W. F. & Williamson, P. B. A model of two conformational forms of heparins/heparans suggested by infrared spectroscopy. **Med. Hypotheses** 24, 131–136, 1987.

GRANT, D., Moffat, C. F., Long, W. F. & Williamson, F. B. Carboxylate symmetric stretching infrared absorbances of chemically modified heparins. **Biochem. Soc. Trans.** 17, 500–501, 1988.

HABERT, Alberto Claudio; BORGES, Cristiano Piacsek; NOBREGA, Ronaldo. **Processos de separação com membranas.** E-papers Serviços Editoriais Ltda. 2006

HAN, W., Li, Q., Lv, Y., Wang, Q. C. & Zhao, X. Preparation and structural characterization of regioselective 4-O/6-O-desulfated chondroitin sulfate. **Carbohydr. Res.** 460, 8–13, 2018.

HAO, C. *et al.* Heparin: An essential drug for modern medicine. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 163, p. 1–19, 2019.

HARADA, M. *et al.* G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. **Nature Medicine**, v. 11, n. 3, p. 305–311, mar. 2005.

HARWS, M. J. & Turvey, J. R. Sulfates of monosaccharides and derivatives Part VIII. Infrared spectra and optical rotations of glycoside sulfates. **Carbohydrates Resouce** 15, 51–56, 1970.

HEIT, J. A. The epidemiology of venous thromboembolism in the community.

- Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 3, p. 370–372, 2008.
- HIGASHI, K. *et al.* Photochemical preparation of a novel low molecular weight heparin. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1737–1743, 2012.
- INGLE, R. G.; AGARWAL, A. S. A world of low molecular weight heparins (LMWHs) enoxaparin as a promising moiety - A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 148–153, 2014.
- JANDIK, K. A. *et al.* Accelerated stability studies of heparin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 1, p. 45–51, 1996.
- SPENCER, JOHN A.; JOHN F. KAUFFMAN; JOHN C. REEPMAYER; CONNIE M. GRYNIEWICZ, W. Y. D. Y. T. L. F. B. B. J. W. Screening of Heparin API by Near Infrared Reflectance and Raman Spectroscopy. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 98, n. 10, p. 3540–3547, 2009.
- KIM, S. Y. *et al.* Characterization of heparin and severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike glycoprotein binding interactions. **Antiviral Research**, v. 181, 2020.
- KWON, P. S. *et al.* Sulfated polysaccharides effectively inhibit SARS-CoV-2 in vitro. **Cell Discovery**, v. 6, n. 1, p. 4–7, 2020.
- KUMAR, P. *et al.* Perspective of membrane technology in dairy industry: A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 9, p. 1347–1358, 2013
- LEDSON, M. *et al.* Nebulized heparin in Burkholderia cepacia colonized adult cystic ® brosis patients. v. i, p. 36–38, 2001.
- LEVAN, M. D.; CARTA, G.; YON, M. C. Adsorption and Ion Exchange. In: [s.l: s.n.]. p. 16–23.
- LINHARDT, R. **Heparin: An Important Drug Enters its Seventh Decade** **Chemistry and Industry**, 1991. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=11551992>>
- LINHARDT, R. J. 2003 Claude S. Hudson award address in carbohydrate chemistry. Heparin: Structure and activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 13, p. 2551–2564, 2003.
- LINHARDT, R. J.; SIBEL GUNAY, N. U. R. **Production and chemical processing of low molecular weight heparins** **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, 1999.
- LONGAS, M. 0; BREITWEISER, K. 0. Sulfate Composition of Glycosaminoglycans Determined by Infrared Spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, v. 192, p. 193–196,

1991. LUCY, C. A. Evolution of ion-exchange: From Moses to the Manhattan Project to Modern Times. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 711–724, 2003.
- MAINRECK, N. *et al.* Rapid Characterization of Glycosaminoglycans Using a Combined Approach by Infrared and Raman Microspectroscopies. **J. Pharm. Sci.** 100, 441–450, 2010.
- MARCATI, A. *et al.* Extraction and fractionation of polysaccharides and B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by membrane technology. **Algal Research**, v. 5, n. 1, p. 258–263, 2014.
- MCFARLANE, R. G. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier. **Nature**, v. 1, p. 499–502, 1964.
- MEER, J. VAN DER; KELLENBACH, E.; BOS, L. J. VAN DEN. From Farm to Pharma : An Overview of Industrial. p. 1–13, 2017.
- MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**, Center for membrane science and technology, University of Twente, The Netherlands, 2000.
- MÜLLER, F. *et al.* New sulfonated polystyrene and styrene-ethylene/butylene-styrene block copolymers for applications in electro dialysis. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 38, p. 11767–11779, 2012.
- MULLOY, B.; HOGWOOD, J.; GRAY, E. Biologicals Assays and reference materials for current and future applications of heparins. **Biologicals**, v. 38, n. 4, p. 459–466, 2010.
- NEELY, B. W. Infrared Spectra of Carbohydrates. *Adv. Carbohydrates Chemical* 12, 13–33, 1957.
- ORR, S. F. D. Infra-Red Spectroscopic Studies of Some Polysaccharides. **Biochim. Biophys. Acta** 14, 173–181, 1954.
- PA, A. P. A. *et al.* Review article : potential therapeutic applications and mechanisms of action of heparin in inflammatory bowel disease. 2000.
- PADAKI, M. *et al.* Membrane technology enhancement in oil-water separation. A review. **Desalination**, v. 357, p. 197–207, 2015.
- PREVITALI, E. *et al.* Risk factors for venous and arterial thrombosis. **Blood Transfusion**, v. 9, n. 2, p. 120–138, 2011.
- RAN, J. *et al.* Ion exchange membranes: New developments and applications. **Journal of Membrane Science**, v. 522, p. 267–291, 2017.
- RAPOSO DE MELLO, D. Farmacopeia Brasileira. **Farmacopeia Brasileira, 5ª edição**,



v. 2, p. 1–523, 2010.

REZZADORI, K. *et al.* Characterization and performance of reverse osmosis and nanofiltration membranes submitted to subcritical and supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 39–46, 2017.

SAITO, A.; MUNAKATA, H. Analysis of plasma proteins that bind to glycosaminoglycans. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1770, n. 2, p. 241–246, 2007.

TAHIR AHMED, J. G. AND I. D. The New England Journal of Medicine Downloaded from [nejm.org](http://nejm.org) on August 11, 2015. For personal use only. No other uses without permission. Copyright © 1993 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. **the new england journal of medicine**, v. 329 n2, p. 90–95, 1993.

TIPSON, R. S. Infrared Spectroscopy Of Carbohydrates A Review. **National Bureau of Standards Monograph 110**, 1968.

TOIDA, T.; LINHARDT, R. J. GAG as copper (II) complex in CEElectrophoresis. 1996.

TOLLEFSEN, D.; PESTKA, A. Heparin cofactor II activity in patients with disseminated intravascular coagulation and hepatic failure. **Blood**, v. 66, p. 769–774, 1985.

TURPIE, A. G. G. *et al.* Fondaparinux vs Enoxaparin for the Prevention of Venous Thromboembolism in Major Orthopedic Surgery A Meta-analysis of 4 Randomized Double-blind Studies. 2002.

VISKOV, C. *et al.* Isolation and characterization of contaminants in recalled unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 15, n. 4, p. 395–401, 2009.

VLODAVSKY, I.; SANDERSON, R. D. ;; ILAN, N. Heparanase. Cham: Springer International Publishing, 2020. v. 1221

VREEBURG, J.-W.; BAAUW, A. **WO 2010/110654 A1**, 2010.

WALENGA, J. M.; LYMAN, G. H. Evolution of heparin anticoagulants to ultra-low-molecular-weight heparins: A review of pharmacologic and clinical differences and applications in patients with cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 88, n. 1, p. 1–18, 2013.

WANG, T.; LIU, L.; VOGLMEIR, J. Chemoenzymatic synthesis of ultralow and low-molecular weight heparins. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1868, n. 2, p. 140301, 2020.

YAGINUMA, S. R. **Extração e purificação parcial de inulina a partir de Yacon**

**(Smallanthus sonchifolius) por adsorção em resina de troca iônica.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

YATES, E. A.; RUDD, T. R. Recent innovations in the structural analysis of heparin.

**International Journal of Cardiology**, v. 212, p. s5–s9, 2016.

ZANG, H. *et al.* Application of near-infrared spectroscopy combined with multivariate analysis in monitoring of crude heparin purification process. **Spectrochimica Acta - Part**

**A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 109, p.