UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Oscar Antonio Nino Santisteban

Desenvolvimento e caracterização tromboelastrográfica de novos agentes hemostáticos baseados em Pectinas com potencial para aplicações em uso cirúrgico e odontológico visando tratamento anti-hemorrágico

São José do Rio Preto

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Oscar Antonio Nino Santisteban

Desenvolvimento e caracterização tromboelastrográfica de novos agentes hemostáticos baseados em Pectinas com potencial para aplicações em uso cirúrgico e odontológico visando tratamento anti-hemorrágico

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em **Biofísica Molecular**, junto ao Programa de Pós-Graduação em **Biofísica Molecular**, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES 88882.434369/2019-01

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

São José do Rio Preto

2022

S236d

Santisteban, Oscar Antonio Niño

Desenvolvimento e caracterização tromboelastrográfica de novos agentes hemostáticos baseados em Pectinas com potencial para aplicações em uso cirúrgico e odontológico visando tratamento anti-hemorrágico / Oscar Antonio Niño Santisteban. -- São José do Rio Preto, 2022

109 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: José Geraldo Nery

1. Hemorragia. 2. Pectina. 3. Biopolímeros. 4. Agentes Hemostáticos. 5. Cascata de Coagulação. I. Título.

Oscar Antonio Nino Santisteban

Desenvolvimento e caracterização tromboelastrográfica de novos agentes hemostáticos baseados em Pectinas com potencial para aplicações em uso cirúrgico e odontológico visando tratamento anti-hemorrágico

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em **Biofísica Molecular** junto ao Programa de Pós-Graduação em **Biofísica Molecular**, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES 88882.434369/2019-01

Comissão Examinadora

Prof. Dr. JOSÉ GERALDO NERY
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Profª. Drª. LAIS PELLIZZER GABRIEL
UNICAMP- Universidade Estadual de Campinas- Limera S.P

Prof. Dr. EDUARDO RIBEIRO DE AZEVÊDO
USP- Universidade de São Paulo- São Carlos S.P

Prof. Dr. JOÃO RUGGEIRO NETO
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. JORGE CHAINE
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
28 de Abril de 2022

DEDICATORIA

Dedico este trabalho a minha família, meus pais, Leonor e Antonio, as minhas irmãs, Liliana e Ângela, a minha sobrinha Veronica, e meus gatinhos, sem eles não teria razão nenhuma para fazer os projetos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, o professor Doutor José Geraldo Nery, sem a sua persistência não teria conseguido a oportunidade de fazer este projeto muito importante para a minha vida.

A minha família, especialmente a minha mãe Leonor Santisteban, que sempre me apoiaram em arriscar para conseguir as metas como meu mestrado, e agora como o meu doutorado. A minha irmã Angela que foi a companhia nestes 4 anos e quem foi o suporte nesse período difícil como foi a pandemia.

Aos meus colegas de laboratório, aos “Pedrinhos”, Vinicius, Erick e Guilherme, que ajudaram em conversações e apoio científico, além de compartilhar conversações cotidianas sobre futebol principalmente que faziam ainda mais agradável o ambiente no laboratório. Ao Alex e Adriano, pessoas que admiro e respeito como pessoas e pesquisadores e que deram algumas dicas para o desenvolvimento do meu doutorado. Um reconhecimento muito especial para a minha mão direita no laboratório Guilherme Molinari Sacco, que antes e no médio da pandemia me ajudo muito nas práticas do laboratório. Não vou a esquecer os momentos que compartilhamos nos churrascos em casa.

Ao serviço técnico do departamento de física da IBILCE , ao Barbosa e o Bruno, pelas ajudas na manutenção e ajudas necessárias para poder fazer de melhor maneira os experimentos, e a todo o pessoal de apoio da UNESP, os quais agradeço muito pelo tempo e disposição para atender as necessidades e questões que eu teve durante o desenvolvimento do projeto.

Os meus amigos que fiz aqui em Rio Preto, Débora, Sergio, Tatiani, Mery, Julaisa, Melanie, Gino e Rodiak, que nos acompanharam em nossos labores acadêmicos e algum que outro aniversario e churrasco.

A meus amigos da Colômbia, que estão aí sempre para a gente, pelo apoio e as palavras especialmente durante a pandemia.

A todos eles e outros mais que tal vez esqueci de nomear, agradeço imensamente o apoio para comigo e minha família, este é o resultado de isso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - 88882.434369/2019-01 à qual agradeço.

Agradeço à FAPESP pelo apoio com o projeto regular, sob o processo nº 2019/01858-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

Apesar dos avanços na intervenção médica, as complicações hemorrágicas continuam a ser uma das principais causas de morte em todo o mundo. Assim, o desenvolvimento de métodos eficazes para o tratamento de hemorragias descontroladas tornou-se uma das prioridades em vários centros de pesquisa médica. Por definição um agente hemostático ideal deve ter a capacidade de interromper o sangramento arterial e venoso, estar disponível para uso imediato, ser funcional e de fácil aplicação, leve, durável, estável e, seguro e de baixo custo. Atualmente existem no mercado agentes hemostáticos feitos à base de materiais inorgânicos e orgânicos, ou mesmo compósitos. Entre os materiais orgânicos destaca-se o grupo de agentes hemostáticos elaborados a partir de biopolímeros naturais tais como quitosana e celulose. O conjunto de certas características inerentes à esses biopolímeros tais como o tamanho de suas cadeias moleculares, a possibilidade e facilidade de modulação da densidade de cargas dessas cadeias, controle do grau de cristalinidade, da área superficial externa, do grau de hidrofobicidade/hidrofobicidade, e biocompatibilidade favorecem o seu uso como matéria-prima para a produção de agentes hemostáticos tópicos. Embora, os biopolímeros quitosana, celulose, e alginato tenham encontrados aplicações como agentes hemostáticos não híbridos, o mesmo não ocorre com um outro biopolímeros abundante na biomassa brasileira: a pectina.

Os esforços dessa pesquisa de doutorado foram voltados ao desenvolvimento de vários agentes hemostáticos à base de pectinas na forma de hidrogeis reticulados com íons de cálcio (Ca^{2+}) e polietilenoglicol, resultando em 4 diferentes tipos de agentes hemostáticos denominados de PEC-PEG, PEC-PEG-Ca-0.5, PEC-PEG-Ca-3.0, PEC-PEG-Ca-5.0 . Os agentes hemostáticos poliméricos foram caracterizados por técnica de Difração de raios-x (DRX), Espectroscopia no infravermelho (FT-IR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Ressonância Magnética Nuclear no Estado Solido (NMR-MAS), Espectroscopia por dispersão de energia (EDS) evidenciando as ligações cruzadas (crosslinked) entre as unidades de acido D-galacturônico da pectina e os cátions de cálcio, resultando na estrutura denominada de “ egg-box”.

O potencial hemostático dos filmes de pectina PEC-PEG, PEC-PEG-Ca-0.5, PEC-PEG-Ca-1.5, PEC-PEG-Ca-3.0, PEC-PEG-Ca-5.0 foram estudados in vitro usando sangue humano e sangue de carneiro (Santa Inês Ovis aires) através de ensaios

tromboelastograficos. As principais parâmetros tromboelastograficos estudados foram : a) parâmetro R que é o tempo de reação para de formação de um coágulo de com tamanho de aproximadamente 2 mm, que caracteriza o início da produção de fibrina, b) o parâmetro K que é o tempo de formação de um coágulo firme de 20 mm e a taxa de geração de trombina e a conversão de fibrinogênio em fibrina, c) o parâmetro ou ângulo α (alfa): que é a inclinação entre os parâmetros R e K, representando a taxa de geração de trombina e a conversão de fibrinogênio em fibrina, demonstrando a rapidez ou cinética de formação de fibrina, ou de um coágulo sólido d) o parâmetro MA que descreve a propriedade elástica da fibrina formada e adesão plaquetária. Os valores de R, K e MA obtidos para os materiais PEC-PEG, PEC-PEG-Ca-0.5, PEC-PEG-Ca-3.0, PEC-PEG-Ca-5.0. Os agentes hemostáticos que mais se destacaram em comparação com os demais agentes hemostáticos foram os materiais PEC-PEG-Ca-3.0 e PEC-PEG-Ca-5.0 apresentaram valores para o parâmetro R entre 5.1- 6.9 min, e parâmetro MA entre 59-62 mm. Estes valores estão de acordo com valores relatados para agentes hemostáticos a base de quitosana, agentes hemostáticos compósitos (quitosana-zeolitas, pectina-alginatos) e agentes hemostáticos inorgânicos como zeólita Faujasita (FAU) e zeólita A (LTA). No decorrer deste estudo foi observado um “swelling effect” não homogêneo para todos os materiais relatados neste estudo e foi estudado com mais detalhes para a amostra PEC-PEG-5. Neste caso, foi observado que a estabilidade morfológica dos filmes reticulados com cátions Ca^{2+}, induz os filmes a voltarem a sua forma morfológica original após um certo tempo, o que leva a conclusão que o aumento da viscosidade ao longo da linha simétrica dos filmes aumenta o fator de absorção e, portanto, a ação hemostática do materiais PEC-PEG-Ca-0.5, PEC-PEG-Ca-3.0, PEC-PEG-Ca-5.0.

Palavras-chave: Hemorragia. Biopolímeros. Pectina. Agente Hemostático. Cascata de coagulação.

ABSTRACT

Despite advances in medical intervention, bleeding complications remain a leading cause of death worldwide. Thus, the development of effective methods for the treatment of uncontrolled bleeding has become one of the priorities in several medical research centers. By definition, an ideal hemostatic agent must have the ability to stop arterial and venous bleeding, be available for immediate use, be functional and easy to apply, lightweight, durable, stable, and safe and inexpensive. Currently, there are hemostatic agents on the market made from inorganic and organic materials, or even composites. Among the organic materials, the group of hemostatic agents made from natural biopolymers such as chitosan and cellulose stands out.

The set of certain characteristics inherent to these biopolymers such as the size of their molecular chains, the possibility and ease of modulation of the charge density of their chains, control of the degree of crystallinity, the external surface area, the degree of hydrophobicity/hydrophobicity, and biocompatibility favor its use as a raw material for the production of topical hemostatic agents. Although chitosan, cellulose, and alginate biopolymers have found applications as non-hybrid hemostatic agents, the same does not occur with another abundant biopolymer in Brazilian biomass: pectin.

The efforts of this doctoral research were focused on the development of several hemostatic agents based on pectins in the form of hydrogels crosslinked with calcium ions (Ca2+) and polyethylene glycol. These efforts had lead to the syntheses of 4 different types of hemostatic agents herein named PEC-PEG, PEC-PEG -Ca-0.5, PEC-PEG-Ca-3.0, PEC-PEG-Ca-5.0. These polymeric hemostatic agents were characterized by X-ray Diffraction (XRD), Infrared Spectroscopy (FT-IR), Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermal Gravimetric Analysis (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Solid State Nuclear Magnetic Resonance (NMR-MAS), Energy Dispersion Spectroscopy (EDS), clearly showing the crosslinked links between the D-galacturonic acid units of pectin and the calcium cations, which has resulted in a molecular structure named "egg" -box".

The hemostatic potential of PEC-PEG, PEC-PEG-Ca-0.5, PEC-PEG-Ca-3.0, PEC-PEG-Ca-5.0 pectin films were studied in vitro using human blood and sheep blood (Santa Inês Ovis aires) through thromboelastographic assays. The main thromboelastographic

parameters studied were: a) parameter R, which is the reaction time for the formation of a clot with a size of approximately 2 mm, which characterizes the beginning of fibrin production, b) the parameter K, which is the time of formation of a 20 mm firm clot and the rate of thrombin generation and the conversion of fibrinogen to fibrin, c) the parameter or angle α (alpha): which is the slope between the R and K parameters, representing the generation rate of thrombin and the conversion of fibrinogen to fibrin, demonstrating the rapidity or kinetics of fibrin formation, or a solid clot d) the MA parameter that describes the elastic property of the fibrin formed and platelet adhesion.

The R, K and MA values obtained for the materials PEC-PEG, PEC-PEG-Ca-0.5, PEC-PEG-Ca-3.0, PEC-PEG-Ca-5.0. The hemostatic agents that were most outstanding in comparison with the other hemostatic agents were the materials PEC-PEG-Ca-3.0 and PEC-PEG-Ca-5.0 which have presented values for the parameter R between 5.1- 6.9 min, and parameter MA between 59- 62 mm. These values are in agreement with reported values for chitosan-based hemostatic agents, composite hemostatic agents (chitosan-zeolites, pectin-alginates) and inorganic hemostatic agents such as Faujasite zeolite (FAU) and zeolite A (LTA). During this study, a non-homogeneous swelling effect was observed for all materials reported in this study and it was studied in more detail for the PEC-PEG-5 sample. In this case, it was observed that the morphological stability of the films crosslinked with Ca2+ cations, induces the films to return to their original morphological shape after a certain time, which leads to the conclusion that the increase in viscosity along the symmetrical line of the films increases the absorption factor and, therefore, the hemostatic action of the materials PEC-PEG-Ca-0.5, PEC-PEG-Ca-3.0, PEC-PEG-Ca-5.0.

Keywords*: Hemorrage. Biopolymers. Pectin. Hemostatic Agent. Coagulation Cascade.*

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. A cascata de Coagulação..... 17
Figura 2. Esquema da nova cascata de coagulação (O modelo celular)..... 20
Figura 3. (a) Repetição de segmento da molécula do componente principal da pectina e grupos funcionais: (b) ácido d-galacturônico; (c) éster metílico..... **29**
Figura 4. Conformação estrutural de"Egg-Box"entre íons de cálcio e grupos carboxila 32
Figura 6. Exemplo de difratograma do biopolímero de Pectina..... 36
Figura 7. Excitação das ligações químicas através de absorção de ondas eletromagnéticas 38
Figura 8. Exemplo de Espetro Infravermelho (FT-IR) típico de uma Pectina 39
Figura 10. Imagem ilustrativa do princípio de funcionamento do equipamento Tromboelastógrafo Haemoscope modelo 5000..... 47
Figura 11. Exemplo de Tromboelastograma 48
Figura 12. Apresentação esquemática de diferentes Tromboelastogramas refletindo diferentes estados do sistema de coagulação em comparação com uma medida normal49
Figura 13. DRX dos materiais à base de pectina. A) Pectina 74% (Pec 74%), B) PEC-PEG, C) PEC-PEG-Ca-0.5, D) PEC-PEG-Ca-3, E) PEC-PEG-Ca-5..... 56
Figura 14. Espectroscopia de infravermelho para as amostras A) Pectina 74%; B) PEC-PEG; C. PEC-PEG-Ca-0.5; D) PEC-PEG-Ca-3; E) PEC-PEG-Ca-5; Espectro no range de 0 a 4000 cm^{-1}; B) Inset da região entre 800 e 2000 cm^{-1} 57
Figura 15. Exemplo de conformação da estrutura tipo "egg-box" e seus modos de vibração. 58
Figura 16. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear: A) Pectina 74% e os filmes PEC-PEG, PEC-PEG-0,5%, PEC-PEG-3% e PEC-PEG-5%; B) Tecnica 13C SPEMAS para a mobilidade do PEG na formação dos filmes..... 58
Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura dos filmes: A) PEC-PEG, B) PEC-PEG-0.5, C) PEC-PEG-3, D) PEC-PEG-5 com magnitudes de 250, 1000 e 4000x respetivamente. O "Side View" tem uma magnitude de 4000x. 62
Figura 18.EDS dos filmes reticulados. A) PEC-PEG-Ca-0.5 B) PEC-PEG-Ca-3 C) PEC-PEG-Ca-5..... 63

Figura 19. Espetros de emissão do EDS das amostras A) PEC-PEG-Ca-0.5, B) PEC-PEG-Ca-3, C) PEC-PEG-Ca-5 64
Figura 20. DSC das amostras A) Pectina 74%, B) PEC-PEG, C) PEC-PEG-0.5, D) PEC-PEG-3, E) PEC-PEG-5**.** 66
Figura 21. Porcentagem de absorção da Água na superfície dos filmes: A) Tempo de 20 segundos; B) Tempo de 60 segundos 67
Figura 22. Absorção do Sangue superficial para os filmes: A) 20 segundos de interação; B) 60 segundos de interação 68
Figura 23. Sequência de tempo de absorção do filme PEC-PEG-Ca-5, em intervalos de 10 segundos 69
Figura 24. Sequência de tempo de absorção do filme PEC-PEG-Ca-5 em intervalos de 10, 70 e 120 segundos. 70
Figura 25. A) Superfície do material reticulado (PEC-PEG-Ca-5) B) Sangue de Carneiro Santa Inês (Ovis aires) (Controle) 71
Figura 26. Sequência de absorção dos filmes reticulados: Exemplo de PEC-PEG-Ca-5, em tempos de 0 min (primeiro contato com a superfície), e 2 e 4 minutos respetivamente 72
Figura 27. Absorção do sangue dos filmes em tempos 0min, 2 min e 4 min: A) PEC-PEG; reticulados :B) PEC-PEG-Ca-0.5 D) PEC-PEG-Ca-3, E) PEC-PEG-Ca-5, em magnitude de 50 µm 72
Figura 28. PEC-PEG-Ca-3. Imagens coletadas, a cada 10 segundos, para a amostra PEC-PEG-Ca-3 a partir do que ocorre no intervalo de 2-4 minutos 75
Figura 29. Microscopia de contraste dos filmes reticulados em tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 10 min 20 µl do sangue: A) PEC-PEG-Ca-0.5, B) PEC-PEG-Ca-3, C) PEC-PEG-Ca- 5 .. 76
Figura 30. Comparação dos tromboelastogramas dos filmes de PEC-PEG com respeito aos ensaios Controle e Quick Clot..... 78
Figura 31. Comparação dos tromboelastogramas dos filmes de PEC-PEG-Ca-0.5 com respeito aos ensaios Controle e Quick Clot 79
Figura 32. Comparação dos tromboelastogramas dos filmes de PEC-PEG-Ca-3 com respeito aos ensaios Controle e Quick Clot 80
Figura 33. Comparação dos tromboelastogramas dos filmes de PEC-PEG-Ca-3 com respeito aos ensaios Controle e Quick Clot 81
Figura 34. Comparação dos Tromboelastogramas dos ensaios descritos dos filmes a base de Pectina e sua comparação com Controle e o agente hemostático Quick Clot ... 82

INDICE DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de alguns agentes hemostáticos comerciais segundo a Anvisa. Descrição do material base ou princípio ativo, mecanismos de ação e o nome do produto comercial**.** 26

Tabela 2. Parámetros Tromboelastográficos dos parametros R, K, α e MA das amostras Controle, Quick Clot e PEC-PEG 77

Tabela 3. Parámetros Tromboelastográficos dos parametros R, K, α e MA das amostras Controle, Quick Clot e PEC-PEG-Ca-0.5 79

Tabela 4. Parámetros Tromboelastográficos dos parametros R, K, α e MA das amostras Controle, Quick Clot e PEC-PEG-Ca-3 80

Tabela 5. Parámetros Tromboelastográficos dos parametros R, K, α e MA das amostras Controle, Quick Clot e PEC-PEG-Ca-5 81

Tabela 6. Comparação dos tempos de reação de materiais a base de Pectina Híbridos e filmes a base de Pectina..... 85

Tabela 7. Comparação dos parâmetros Tromboelastograficos de agentes hemostáticos híbridos a base de quitosana com filmes a base de pectina 86

Tabela 8. Comparação dos parâmetros Tromboelastograficos de microesferas de Quitosana com os Filmes de Pectina 87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

DRX – Difração de Raios-X

FT-IR – Espectroscopia de Infravermelho

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

EDS– Espectrometria de Raios-X por Energia Dispersiva

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura

TEG- Tromboelastografía

$CaCl_2$ – Cloreto de Cálcio

PEC- Pectina

PEG- Polietileno Glicol

TP- Tempo de Protrombina

TTPa – Tempo de tromboplastina parcial ativada

TF- Fator Tecidual

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO 16

1.1 Hemorragias 16

1.2 Cascata de coagulação e fases de coagulação 17

1.3 Modelo celular 17

1.4 Fases da Coagulação 18

1.5 Agentes hemostáticos 20

1.6 Classes de Agentes hemostáticos 21

1.6.1 Agentes hemostáticos à base de inorgânicos: 21

1.6.2 Agentes hemostáticos à base de derivados Biológicos 22

1.6.3 Agentes hemostáticos sintéticos. 23

1.6.4 Agentes hemostáticos à base de Polissacarídeos. 24

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA: PECTINA 28

2.1 Substâncias Pécticas 28

2.1.1 Estrutura da Pectina 28

2.1.2 Grau de esterificação 30

2.1.3 Estruturas tipo "Egg-Box" 31

2.2 Aplicação da pectina 32

2.3 Pectina como agente hemostático 33

3. Técnicas Fisico-Químicas de Caracterização 35

3.1 Difração de Raios-x 35

3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura 37

3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR) 38

3.4 Microscopia de Contraste de Fase 39

3.5 Estudos Térmicos via Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) 41

3.6 Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido rotação em torno do Ângulo Mágico (^{13}C RMN-MAS) 41

3.7 Absorção de água e sangue dos polímeros hemostáticos à base de pectina 44

3.8 Análises Tromboelastográficas (TEG) 45

4. OBJETIVOS 51

4.1 Objetivos gerais 51

*4.1.1 Objetivos específicos **51***

5. Materias é Métodos 53

5.1 Sínteses dos materiais 53

6. Resultados **54**
6.1 Difração de raios-x dos materiais poliméricos a base de pectina 54
6.2 Espectroscopia no infravermelho-FTIR 56
6.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 58
6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 61
6.5 Análise térmica dos materiais poliméricos sintetizados 65
6.6 Avaliação da absorção físico-química de água e sangue. 66
6.7 Avaliação da ação hemostática dos filmes usando microscopia de contraste. 70
6.8 Tromboelastografia (TEG) 76
6.9 Discussão dos resultados tromboelastrograficos obtidos com os filmes preparados nesse estudo em comparação com literatura cientifica e patentária. 83
7. CONCLUSÕES **89**
8. PERSPECTIVAS FUTURAS **90**
REFERENCIAS **91**
ANEXO I: DEPÓSITO DA PATENTE DA INVENÇÃO **102**

1. INTRODUÇÃO

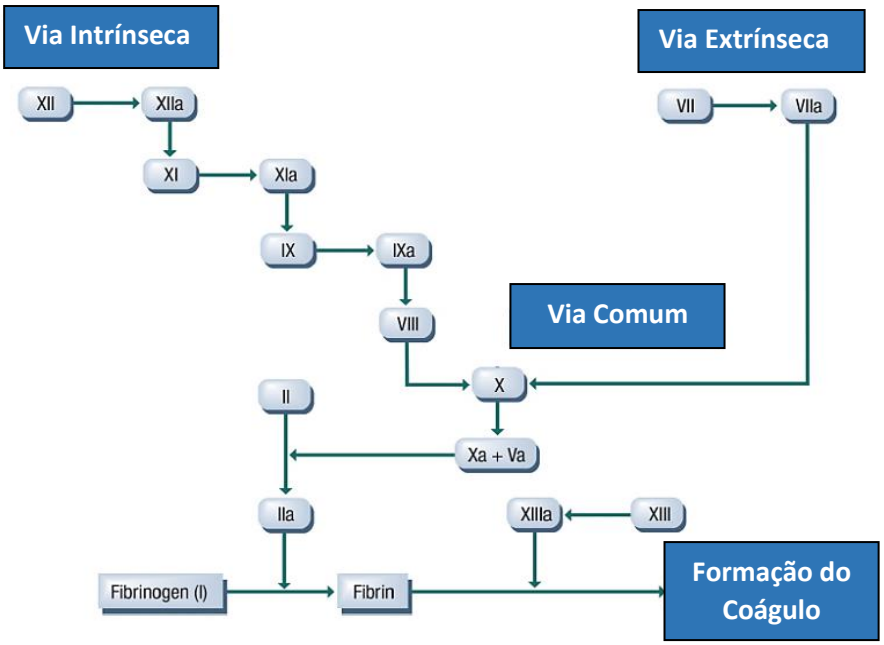
1.1 Hemorragias

Hemorragias incontroladas são uma das principais causas de mortes de pacientes, e podem ocorrer em uma variedade de situações clínicas, incluindo traumas, hemorragias pós-operatórias, aneurisma da aorta, hemorragias gastrointestinais, hemorragias obstétricas, entre outros tipos(COAGUILA LLERENA; MENDIOLA AQUINO, 2015; MÁRMOL et al., 2013; NEUFFER et al., 2004). Após uma lesão traumática, a cessação do sangramento ou hemostasia, se estabelece por meio de uma série de eventos bioquímicos responsáveis pela prevenção da perda de sangue através de vedação local da lesão no sistema vascular(ADAMS; BIRD, 2009).

Hemostasia é um processo dinâmico pelo qual a coagulação do sangue é iniciada e finalizada de forma rápida e moda rigidamente(NEUFFER et al., 2004). A coagulação do sangue consiste num complexo mecanismo de defesa que ocorre após da lesão dos vasos sanguíneos, as plaquetas se aderem formando macromoléculas nos tecidos subendoteliais no local da lesão formando um tampão hemostático primário. As plaquetas estimulam a ativação local de fatores de coagulação do plasma, o que leva à geração de um coágulo de fibrina que reforça o agregado plaquetário. A medida que a cicatrização da ferida evolui, o agregado plaquetário e o coágulo de fibrina são quebrados e removidos (TOMPECK et al., 2020).

O processo hemostático é dividido em duas fases principais: hemostasia primária e secundária. A hemostasia primária é iniciada imediatamente após a ruptura do endotélio e é caracterizada pela vasoconstrição, a adesão de plaquetas e formação do tampão plaquetário. Na hemostasia secundária ocorre ativação da cascata da coagulação envolvendo várias proteínas do plasma, íons cálcio, e plaquetas sanguíneas que levam à conversão do fibrinogênio em fibrina (PEREIRA; BORTOTO; FRAGA, 2018). Uma vez iniciado o processo de coagulação, a finalização desse mesmo processo ocorre através de um sistema complexo de reações envolvendo fatores de coagulação (figura 1).

Figura 1. A cascata de Coagulação



Adaptado de: (BRACEY et al., 2017)

Na etapa final do processo de coagulação a trombina converte o fibrinogênio do plasma em fibrina insolúvel que reforça a agregação plaquetária e na formação de um coágulo estável, e com a evolução do processo de cicatrização, as plaquetas agregadas e o coágulo de fibrina são removidos do organismo. (SAMUDRALA, 2008).

1.2 Cascata de coagulação e fases de coagulação

Embora o modelo da hemostasia é um processo bastante complexo por envolver reações complexas e simultâneas e vários modelos bioquímicos de racionalização desse processo foram propostos com o objetivo de entender os distúrbios clínicos de hemostasia. Entre esses modelos podemos citar: modelo celular, via intrínseca e extrínseca (BECKER, 2005).

1.3 Modelo celular

O modelo celular é baseado em superfícies celulares ou uma matriz altamente entrelaçada de processos físicos, celulares e bioquímicos que contribuem para a hemostasia através de um processo constituído por uma série de fases, através da ativação do processo de coagulação sobre diferentes superfícies celulares. Os complexos

envolvidos na manutenção da integridade vascular compreende quatro fases que se sobrepõem: iniciação, amplificação, propagação e terminação, e estão esquematicamente representados na fig.2 (RIDDEL et al., 2007).

No modelo celular (Figura 2), a hemostasia requer a formação de um tampão de plaquetas e fibrinas impermeável no local da lesão do vaso, mas também exige que as substâncias pró-coagulantes ativadas neste processo permaneçam no local da lesão. O processo de coagulação sanguínea é iniciado por exposição de células que expressam o fator tecidual na corrente sanguínea. O fator tecidual está presente nas membranas das células vizinhas do leito vascular, mas não se encontra, normalmente, em contato como sangue (BECKER, 2005; FERREIRA; SOUSA, 2010).

1.4 Fases da Coagulação

Na fase da iniciação, o complexo TF/FVIIa (fator tecidual/fator VII ativado) ativa o FX diretamente e indiretamente através do FIX, transformando pequenas quantidades de protrombina em trombina, que são ainda insuficientes para a realização do processo de formação da trombina. A interação entre o TF e o FVIIa é um passo fundamental para o início da coagulação (GALVEZ C. et al., 2010; PÉREZ-GÓMEZ; BOVER, 2007)

Na fase de amplificação, a trombina, em conjunto com o cálcio do sangue e o fosfolipídio derivados das plaquetas, participam ativamente no processo de feedback positivo na ativação dos fatores XI, IX, VIII e V, especialmente, para acelerar a ativação plaquetária. Cada interação se inicia com uma enzima e um fator inativado o qual vai funcionar como um substrato e um cofator onde tem interação em uma superfície aniônica como os fosfolipídios de restos celulares ou plaquetas já ativadas, mas para obter uma estabilidade dentro destas ligações o cálcio age como agente gerando estabilidade dentro do processo de ativação de cofatores, nesta forma, o cálcio age como um gatilho, desencadeando a coagulação sanguínea (PEREIRA; BORTOTO; FRAGA, 2018).

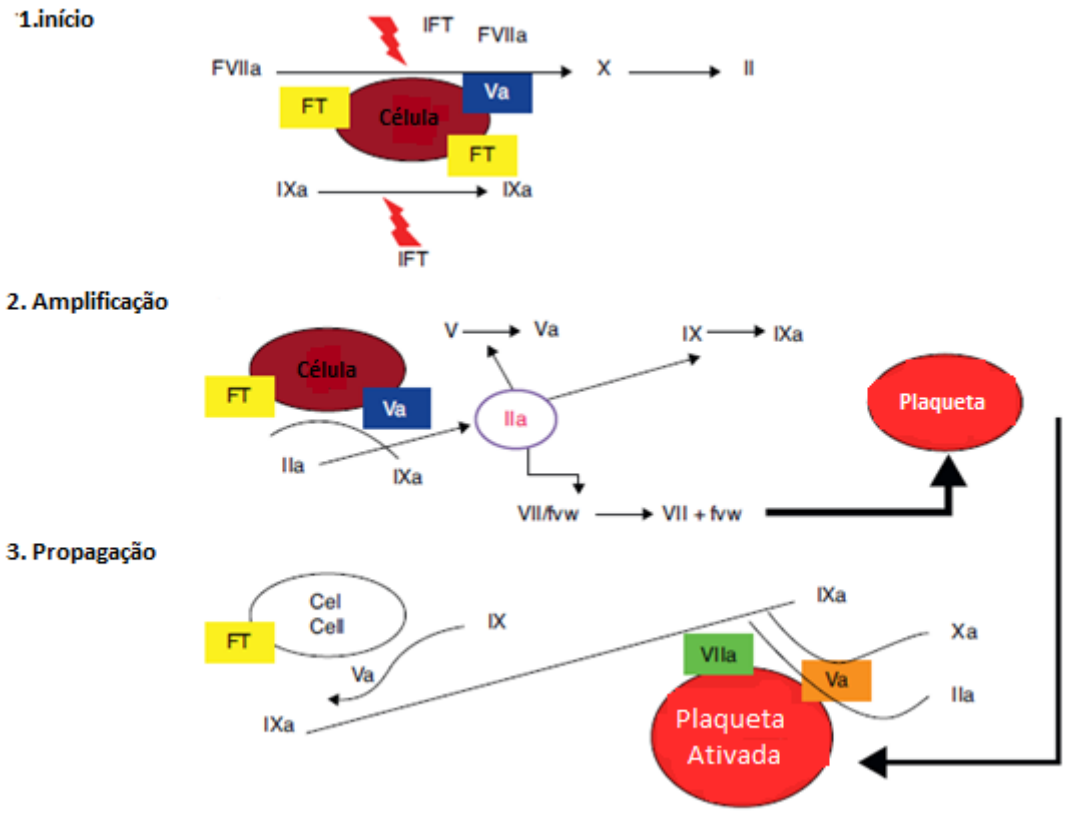
Simultaneamente os fatores mencionados são atraídos através de mecanismos quimiostáticos para a superfície das plaquetas, onde um processo muito importante da ativação e multiplicação ocorrem rapidamente(PÉREZ-GÓMEZ; BOVER, 2007). Uma pequena quantidade de trombina produzida pelo complexo TF-FVIIa é essencial para a amplificação, embora seja insuficiente para a formação do coágulo. A trombina é um agente de recrutamento plaquetário muito ativo, e por feedback positivo pode também ativar os fatores V, VIII e XII. A amplificação é também caracterizada pelo sistema de

feedback negativo através de anticoagulantes naturais: TFPI (do inglês complexo inibidor de TF), antitrombina e proteína C, que desempenha um importante papel na regulação da pró coagulação (GALVEZ C. et al., 2010).

A fase de propagação é caracterizada pelo recrutamento de um grande número de plaquetas para o sítio da lesão e pela produção dos complexos *tenase* e *protrombinase* na superfície das plaquetas ativadas. O FIXa ativado durante a fase de iniciação se liga ao FVIIIa na superfície das plaquetas formando o complexo tenase. Como o FXa não pode se mover efetivamente das células que expressam FT para a plaqueta ativada, maior quantidade de FXa deve ser produzida diretamente na superfície da plaqueta pelo complexo FIXa/FVIIIa (ADAMS; BIRD, 2009).

Finalmente, o FXa rapidamente se associa ao FVa ligado à plaqueta durante a fase de amplificação, resultando na formação do complexo protrombinase, o qual converte grande quantidade de protrombina em trombina. Esta é responsável pela clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina, que polimerizam para consolidar o tampão plaquetário (GALVEZ C. et al., 2010). O processo final, sempre ocorrendo na superfície da plaqueta, acelera e leva a uma explosão na geração de grandes quantidade de trombina em fibrina (PÉREZ-GÓMEZ; BOVER, 2007). A trombina simultaneamente ativa o FXIII e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI) que positivamente adiciona efeitos de estabilização e resistência à plasmina (GALVEZ C. et al., 2010). A ativação plaquetária altera a permeabilidade da membrana, permitindo a entrada de cálcio e a liberação de substâncias quimiostáticas que atraem os fatores de coagulação. O fator V e os fosfolipídios são liberados ao mesmo tempo, fornecendo o complemento necessário a coagulação (GALVEZ C. et al., 2010).

Figura 2. Esquema da nova cascata de coagulação (O modelo celular).



Fonte: (GALVEZ C.; CORTES L., 2012)

1.5 Agentes hemostáticos

Devido à importância do controle do sangramento em cirurgias, batalhas ou traumas cíveis, novas pesquisas em agentes hemostáticos estão sendo desenvolvidas com o objetivo de reduzir o tempo de reação no contato com o sangramento promovendo de maneira efetiva a via normal da cascata de coagulação.

Segundo Pusateri et al. (PUSATERI et al., 2006) um agente hemostático ideal deve ter a capacidade de parar o sangramento tanto arterial quanto venoso até 2 minutos depois da aplicação na lesão; deve estar pronto para o uso sem necessidade de preparação prévia ou pessoal especializado; ser de fácil aplicação; deve ser leve e durável; estável e funcional em temperatura ambiente por pelo menos 2 anos; seguro, sem riscos de causar dano a qualquer tecido no qual seja aplicado; e finalmente deve ser de baixo custo. Adicionalmente Tompeck et al. (TOMPECK et al., 2020) descreve as vantagens da adaptação dos dispositivos hemostáticos nas feridas, além que estes não tenham efeitos adversos ou secundários que possam afetar o organismo, sendo dispositivos de

autoativação, deixando fora qualquer outro sistema de suporte que interfira na sua ação hemostática, assim mesmo que estes dispositivos tenham a capacidade de se remover rápida e efetiva depois de seu uso sobre o sitio de aplicação sem gerar queimaduras ou outro tipo de sequelas.

O finalidade dos agentes hemostáticos é causar a ativação da cascata de coagulação, tendo em conta isto o mecanismo de ação dos agentes hemostáticos estão classificados em 3 grupos : Os concentradores de fatores promotores os quais funcionam absorvendo água do sangue e concentrando os componentes sanguíneos na lesão local; os pro coagulantes os quais agem através da suplementação fatores de coagulação e ativam a coagulação do sangue cascata e os agentes muco adesivos que fornecem uma barreira física para fluxo sanguíneo por reticulação de componentes sanguíneos (ZHONG et al., 2021).

Carvalho et al.(CARVALHO; MARCHI, 2013) classificou os agentes hemostáticos e adesivos teciduais em 3 classes, de acordo com a sua aplicação: hemostáticos tópicos, adesivos teciduais e vedantes e novos produtos. Dentre os hemostáticos tópicos podemos citar: agentes hemostáticos à base de colágeno, celulose, gelatina, trombina, hidrogel de etilenoglicol. Na classe de adesivos teciduais e vedantes: a gelatina com resorcinol e formaldeído, albumina com glutaraldeído, trombina com matriz de gelatina, fibrina e cianoacrilato. Entre os novos produtos se encontra agentes hemostáticos a base de trombinas e fibrinas e agentes hemostáticos a base de materiais zeolíticos que se baseiam na absorção do fluido tecidual por meio de peneiras moleculares que concentra os fatores envolvidos na cascata de coagulação resultando na propagação da hemostasia. (TOMPECK et al., 2020).

1.6 Classes de Agentes hemostáticos

Atualmente agentes hemostáticos disponíveis podem ser agrupados em: a) Agentes hemostáticos a base de inorgânicos, b) Agentes hemostáticos à base de derivados biológicos, c) Agentes hemostáticos sintéticos, d) Agentes hemostáticos à base de Polissacarídeos.

1.6.1 Agentes hemostáticos à base de inorgânicos:

Um agente inorgânico se define como aquele que não usa na sua composição principal agentes biológicos presentes na cascata de coagulação mais implementam outros

princípios físico químicos como a absorção (SUN et al., 2020), e interações iônicas ou eletrostáticas (WANG et al., 2017a) que ajudem na promoção da via normal da cascata de coagulação. Observa-se um grande número de este tipo de agentes baseados em componentes inorgânicos tais como Zeolitas as quais possuem propriedades de grande área superficial e alta porosidade, estimulando o efeito hemostático ao absorver água do sangue e concentrar células sanguíneas, concentrando as plaquetas ativando os fatores de coagulação no local da lesão (LAURENTI et al., 2017). As argilas, outro exemplo desses agentes, aceleram a hemostasia por sua característica de interagir com grandes áreas de superfície, gerando uma troca iônica significativa e tendo uma capacidade superabsorvente (BAKER et al., 2007). Este grupo de argilas tem dois derivados, pois seus componentes são provenientes de este tipo de inorgânico: Caolin e Esmectita.

Os dispositivos baseados em caolin atuam por interações de carga negativa nas superfícies do caolin atingindo diretamente no Fator XII, desencadeando a via intrínseca da cascata de coagulação, que por sua vez ativa o Fator XI e finalmente forma o coágulo (SUN et al., 2017). A esmectita atua absorbendo o componente liquido do sangue e a sua vez induze uma significativa capacidade de troca de cátions, este tipo de argila pode concentrar os fatores de coagulação e plaquetas no local da lesão atuando principalmente na ativação da via intrínseca, acelerando assim a hemostasia (KHEIRABADI et al., 2010).

1.6.2 Agentes hemostáticos à base de derivados Biológicos

Este tipo de agentes, se distinguem pelo uso de proteínas presentes na cascata de coagulação tais como trombina, fibrina, colágeno e gelatina principalmente (TOMPECK et al., 2020) sendo promotores diretos da via comum.

A trombina desempenha funções essenciais na coagulação sanguínea e agregação plaquetária: (I) Ação direta com o fibrinogênio, a trombina converte o fibrinogênio em fibrina para formar coágulos; (II) Os efeitos indiretos são mediados por outros fatores de coagulação. Esse efeito cria um ciclo de feedback: ativando os cofatores FV, FVIII e FX para aumentar sua geração e ativando FXIII para reticular a fibrina em um plugue estável (RONG et al., 2017).

A fibrina pode apresentar 3 tipos de mecanismo de ação hemostático: (I) Atuando como hemostático: os selantes de fibrina podem aumentar os fatores de coagulação in

vivo e ativar a coagulação sanguínea; (II) agindo como um selante: os selantes de fibrina criam uma barreira de vedação que impede fisicamente a perda de sangue de uma estrutura; e (III) agindo como um adesivo: os selantes de fibrina são capazes de auto polimerizar e aderir estruturas quando aplicados em campo seco (ZHANG, 2021).

O colágeno tem duas ações dentro do processo hemostático o qual faz um material de bastante interesse na pesquisa de desenvolvimento de novos materiais hemostáticos pois atinge tanto na trombose como na hemostasia sendo observados os seguintes efeitos: (I) efeitos indiretos mediados pelas plaquetas: Quando os vasos sanguíneos permanecem intactos, o sangue flui suavemente sobre as estruturas subendoteliais que constituem o tecido conjuntivo que contém uma alta porcentagem de colágeno. Uma vez exposto ao fluxo sanguíneo, o colágeno fornece a estrutura da matriz para adesão, agregação e ativação das plaquetas; (II) interação direta com fatores de coagulação: O colágeno ativa a via intrínseca da cascata de coagulação por meio de três fatores de coagulação: a ativação do fator XII, a ligação do fator IX ao colágeno tipo IV e a interação com o fator von Willebrand (vWF) (FARNDALE et al., 2004)

A gelatina pode ser formada por desnaturação térmica ou hidrólise irreversível do colágeno presente no pericárdio bovino ou de pele de porco (ZHONG et al., 2021). Comparada com a fibrina ou colágeno de origem animal, a gelatina é superior em sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa imunogenicidade. Os materiais de gelatina não só absorvem muitas vezes o seu peso de sangue, mas também concentram fatores de coagulação e plaquetas no local da lesão. Depois de absorver a água, o material de gelatina incha, o que, por sua vez, proporciona um efeito compressivo no local da ferida. Além disso, a gelatina pode fornecer uma matriz estrutural para coagulação (LIENING et al., 1997).

1.6.3 Agentes hemostáticos sintéticos.

Os materiais hemostáticos sintéticos são outro tipo de material hemostático que pode ser formulado com outros adjuntos (orgânico-orgânico, inorgânico-orgânico) para melhorar sua biocompatibilidade, estabilidade e desempenho clínico. Destaque-se principalmente os componentes químicos que possam ajudar nessa interação entre elementos adjuntos, tais elementos são o Polietilenoglicol e o Cianoacrilato.

O polietilenoglicol (PEG) é um copolímero de múltiplos braços com um éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) em cada extremidade. Devido à sua excelente biocompatibilidade, alta absorção de água, facilidade de ligação com biomoléculas e múltiplos mecanismos de gelificação, o PEG é amplamente utilizado na formação de hidrogéis. Principalmente o PEG atua como um selante tecidual, apresentando estruturas porosas, excelente resistência mecânica, alta taxa de inchamento e efeito antibacteriano, favoráveis à hemostasia em situações críticas, razão pela qual os agentes hemostáticos que estejam suportados pelo PEG têm sido amplamente estudados no tratamento de vazamento de ar, dissecção aguda da aorta e sangramento de orifício de sutura envolvido em diferentes procedimentos cirúrgicos (BU et al., 2016).

Os monômeros de cianoacrilato, na forma líquida de baixa viscosidade, são sintetizados pela condensação de cianoacetato e formaldeído em condições de calor e vácuo. Quando entra em contato com várias substâncias aniônicas, como o sangue, o monômero cianoacrilato básico se polimeriza em longas cadeias formando o filme adesivo que cola a ferida e mantém as bordas opostas juntas (GRANVILLE-CHAPMAN; JACOBS; MIDWINTER, 2011). O adesivo não precisa ser removido após o uso, pois a substância adesiva geralmente se desprende dentro de 5 a 10 dias à medida que a epiderme se regenera. Apesar de proporcionar um efeito hemostático na aplicação, os adesivos de cianoacrilato não possuem propriedades hemostáticas inerentes para causar coagulação do sangue, mas bloqueiam orifícios no vaso para evitar sangramento. Os adesivos tópicos de cianoacrilato são recomendados para selar feridas de baixa tensão que estão limpas e secas, mas não podem ser usadas isoladamente para fechar feridas de alta tensão. O comprimento e a complexidade da cadeia lateral do cianoacrilato alquila podem afetar diretamente sua resistência mecânica e outras propriedades físicas (SOHN et al., 2016).

1.6.4 Agentes hemostáticos à base de Polissacarídeos.

Um grande grupo onde aproveitam 3 das 4 famílias de biopolímeros: Quitosana, Celulose e Alginato.

A quitosana é um polissacarídeo natural, carregado positivamente, e a forma desacetilada da quitina (um polissacarídeo natural) é encontrada abundantemente em mariscos. A quitosana tem sido amplamente utilizada em áreas biomédicas devido à sua excelente não imunogenicidade e propriedades antimicrobianas, além de sua boa biocompatibilidade e biodegradabilidade. Os dispositivos baseados em quitosana se

destacam pelo seu mecanismo de ação o qual está associado pelas forças eletrostáticas após a ionização da quitosana, agregando assim glóbulos vermelhos (RBCs). A glucosamina carregada positivamente na quitosana pode atrair eritrócitos carregados negativamente para aglutinar, o que, assim, promove a coagulação independente da cascata de coagulação clássica. A quitosana é eficaz em estimular a adesão e agregação plaquetária, possivelmente aumentando a mobilização de Ca^{2+} e aumentando a expressão do complexo GPIIb/IIIa nas superfícies das plaquetas, ajudando assim na alteração da estrutura de formação do fibrinogênio (WEDMORE et al., 2006).

A celulose é um carboidrato que forma o esqueleto da maioria das estruturas vegetais e células vegetais. É o polissacarídeo mais abundante na natureza e é fonte de fibra alimentar. A celulose natural é insolúvel em água, mas a celulose oxidada (OC), um produto de oxidação absorvível da celulose, pode ser regenerada para formar fibras organizadas (celulose regenerada oxidada, ORC) ou permanecer não regenerada com fibras desorganizadas antes da oxidação (celulose não oxidada). celulose regenerada, (ONRC). Após o processo de oxidação, a celulose adquire propriedades hemostáticas e bactericidas. O baixo pH gerado pelo ácido carboxílico pode ativar as plaquetas para estimular a formação de um tampão plaquetário temporário.(SHEFA et al., 2019).

O alginato é um polissacarídeo de ocorrência natural tipicamente obtido de todas as espécies de algas marrons e algumas espécies de bactérias. Sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e custo relativamente baixo são amplamente utilizados para muitas aplicações biomédicas. Demostrou sua ação hemostática por meio da interação de cátions divalentes ou polivalentes, como Ca^{2}+, os quais podem reticular alginato de sódio solúvel em alginato insolúvel. Uma vez que o alginato de cálcio entra em contato com o sangue, o Ca^{2}+ atua como pró-coagulante para ativar o processo de coagulação (WANG et al., 2017a).

As pesquisas em agentes hemostáticos ainda seguem avançando tendo o ponto poder criar agentes hemostáticos em base de compósitos onde podem se misturar componentes orgânicos com inorgânicos ou entre vários componentes das mesmas espécies (celulose-quitosana, colágeno-alginato, etc...), assim como ter agentes duais que possam ter partes ativas como passivas(ZHONG et al., 2021), mas tendo sempre a finalidade principal de um agente hemostático.

Na tabela 1 estão listados alguns exemplos de agentes hemostáticos utilizados na rotina médica e campos de batalhas. Observa-se a existência de muitos preparações com composições e formulações variadas, mecanismos de ação diversos, todos indicados para combater hemorragias de múltiplas naturezas. Conforme pode ser observado na tabela 1, há agentes hemostáticos baseados em derivados orgânicos como a Gelatina (Gelfoam®), Colágeno (HEMOBLAST), mas ultimamente o uso de produtos provenientes de biomassa como quitosana (HemCon) e Celulose (Surgicel), está sendo aproveitada no propósito da hemostasia, agora comercialmente, assim como produtos baseados em outros tipos de todavia não há nenhum material hemostático derivado de pectina. Nas próximas seções discutimos as propriedades físico-química desse abundante polímero natural, o seu potencial de ser usado como matriz para novos agentes hemostáticos e a inovação que tais materiais podem trazer para a área biomédica, principalmente em aplicações cirúrgicas e odontológicas.

.

Tabela 1.Exemplos de alguns agentes hemostáticos comerciais segundo a Anvisa. Descrição do material base ou princípio ativo, mecanismos de ação e o nome do produto comercial.

Classe de Agente Hemostático	Material Base	Mecanismo de Ação	Produto	Referência
Inorgânico	Zeólita	Absorção, *Glass Effect*	Quickclot	(WRIGHT et al., 2004)
	Esmectita	Absorção, capacidade de troca catiônica para estimular a via intrínseca	Wound Seat	(POURSHAHRESTANI et al., 2016)
	Argila	Absorção, promotor da ativação do fator XII	Combat Gauze	(KHEIRABADI et al., 2010)
Derivados Biológicos	Trombina	Ação direta para a promoção de fibrinogênio	Recothrom Thrombin-JMI Evithrom	(RATNER, 2008)

	Fibrina	Aumenta a promoção dos fatores de coagulação.	Evicel Vitagel Evarrest ARTISS	(ROUSOU, 2013)
	Colágeno	Fornece a estrutura da matriz para plaquetas; interagindo com fator XII, FIX, von Willebrand	HEMOBLAST	(BRUCKNER et al., 2019)
	Gelatina	Absorção, funcionalidade com trombina e fibrina	Floseal Surgiflo Gelfoam	(WOLKOW; JAKOBIEC; YOON, 2018)
Sintéticos	Polietilenoglicol	Absorção, Barreira Física	Coseal Duraseal	(BU; PANDIT, 2022)
	Cianoacrilato	Barreira Física	Dermabond Histoacryl	(KOONCE et al., 2015)
Polissacarídeos	Quitosana	Agregação Plaquetária, fornecedor da estrutura de Fibrinogênio	Hemcon Celox TraumaStat	(KHAN; MUJAHID, 2019)
	Celulose	Ativação plaquetária, geração de células sanguíneas.	Surgicel Traumastem	(LEWIS et al., 2013)
	Alginato	Aporte de Ca_2+	Kaltostat Sorbalgon	(BESSEY, 2007)

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA: PECTINA

2.1 Substâncias Pécticas

Substâncias pécticas são carboidratos complexos encontrados primeiramente nas paredes celulares de plantas superiores (ZANELLA, 2013) (angiospermas e gimnospermas), agindo como "agente cimentante", contribuindo tanto para a adesão entre as células, quanto para a resistência mecânica da parede celular (KERTESZ, 1951; THAKUR; SINGH; HANDA, 1997; VAN BUREN, 1991). A concentração mais elevada de pectina é encontrada na lamela média das paredes celulares, com uma redução gradual da parede celular primária para a membrana plasmática nos cítricos (THAKUR; SINGH; HANDA, 1997). As substâncias pécticas influenciam na firmeza das frutas e no aumento da viscosidade dos sucos (TING; ROUSEFF, 1986). Em 1944, o comitê da *American Chemical Society* (ACS) classificou as substâncias pécticas em quatro categorias (KERTESZ, 1951):

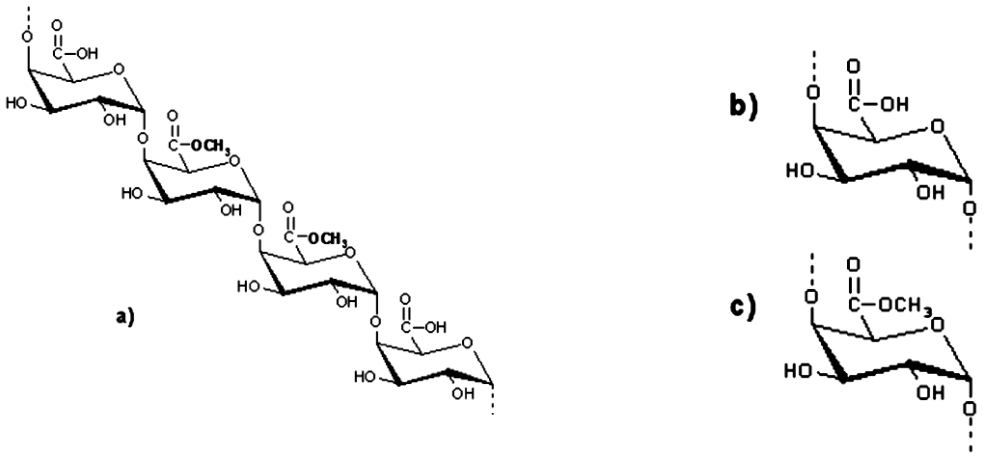
- Ácidos pécticos: são ácidos poligalacturônicos de cadeia longa sem ou com apenas um teor insignificante de grupos metil éster em sua cadeia (BEMILLER, 1986; KERTESZ, 1951; TING; ROUSEFF, 1986);
- Ácidos pectínicos: termo usado para designar ácidos poligalacturônicos que contém uma proporção, maior do que os encontrados nos ácidos pécticos, de grupos metil éster em sua cadeia (BEMILLER, 1986; KERTESZ, 1951; TING; ROUSEFF, 1986);
- Protopectina: Consistem na forma natural da pectina, quando associada à celulose, hemicelulose e lignina. Este termo é aplicado para a pectina insolúvel em água, que se encontra nas plantas. Quando a protopectina é submetida à hidrólise podem-se formar os ácidos pectínicos (BEMILLER, 1986; KERTESZ, 1951; TING; ROUSEFF, 1986);
- Pectina: São os ácidos pectínicos solúveis em água, com teor variável de grupos metil éster que, quando submetido a condições adequadas, são capazes de formar géis (BEMILLER, 1986; KERTESZ, 1951; TING; ROUSEFF, 1986).

2.1.1 Estrutura da Pectina

Pectina (PEC) é um polissacarídeo composto em maior parte de polímeros lineares e como a maioria dos outros polissacarídeos de vegetais, é polidisperso e poli molecular, ou seja, é heterogêneo com relação à sua estrutura química e seu peso molecular

(BEMILLER, 1986). De acordo com Novosel'skaya, Voropaeva *et al*.(NOVOSEL'SKAYA et al., 2000) a composição e a estrutura da pectina são difíceis de determinar, mesmo tendo sido descoberta a mais de 200 anos. Isto porque a estrutura da pectina pode ser alterada durante o seu isolamento, armazenamento e processamento, e segundo Bemiller (1986)(BEMILLER, 1986), parâmetros como o peso molecular e/ou o conteúdo das subunidades particulares que compõe a cadeia, variam de molécula para molécula, em qualquer amostra de pectina. De acordo com Lucas, Soares e Monteiro (2001) (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001), o peso molecular é uma característica importante da pectina que reflete nas suas propriedades funcionais, sendo estas propriedades responsáveis pela aplicação a ser dada à pectina. Para alguns autores, o peso molecular da pectina varia entre 50.000-150.000 D dependendo do tamanho da cadeia (LICANDRO; ODIO, 2002; SRIAMORNSAK, 2003). A estrutura química da pectina consiste de uma cadeia principal linear (c.a. 70%) composta por unidades de ácido d-galacturônico unidas através de ligações glicosídicas α-(1→4), conhecida como região "*smooth*", que são as regiões lisas da cadeia (Fig.3) (BEMILLER, 1986; DE VRIES, 1983; MOHNEN, 2008; ROLIN; DE VRIES, 1990). Dependendo da fonte e do modo de extração da pectina, os grupos carboxilas das unidades do ácido d-galacturônico, são parcialmente esterificados por metanol em diferentes extensões, tornando-se ésteres metílicos e, em certas pectinas, são parcialmente acetilados (BEMILLER, 1986; WANG; PAGÁN; SHI, 2016)

Figura 3. (a) Repetição de segmento da molécula do componente principal da pectina e grupos funcionais: (b) ácido d-galacturônico; (c) éster metílico



Fonte: (SRIAMORNSAK, 2003).

Além dos segmentos mostrados na figura acima, a cadeia da pectina pode ser interrompida por unidades de l-ramnose unidas por ligações α-(1→2), às quais estão ligadas a açúcares neutros, na ordem de 5-10% do peso do ácido d-galacturônico, formando as cadeias laterais. Ramnose, como componente minoritário da cadeia estrutural da pectina, introduz uma leve torção na cadeia linear, enquanto que os açúcares neutros, tais como arabinose, galactose, glucose e xilose ocorrem nas cadeias laterais, formando as regiões "*hairy*" da cadeia, ramificando a estrutura da pectina (DE VRIES, 1983; OAKENFULL, 1991; ROLIN; DE VRIES, 1990). A presença destes açúcares neutros formando cadeias laterais influenciam altamente as propriedades funcionais da pectina, como a capacidade gelificante e a solubilidade (OAKENFULL, 1991), a pectina provinda da lamela média possui inserções menores de ramnose, ramificações mais curtas e em menor quantidade e apresenta teor mais elevado do grau de esterificação do que a pectina da parede celular primária.

2.1.2 Grau de esterificação

Um importante fator característico das cadeias de pectina é conhecido como grau de esterificação (DE – *Degree of Esterification*), que está diretamente relacionado à firmeza e a coesão dos tecidos das plantas, e influencia fortemente a solubilidade e a capacidade de formação de gel, condições estas requeridas para a gelificação. Há uma grande variação no valor do DE dependendo da espécie, tecido e maturidade da fonte de obtenção. Em geral, pectinas provindas dos tecidos das plantas apresentam grau de esterificação por volta de 60-90% (BEMILLER, 1986; VAN BUREN, 1991). A razão entre o ácido d-galacturônico esterificado e o ácido d-galacturônico total é conhecido como grau de esterificação (DE), e compreende a percentagem de grupos carboxilas esterificadas pelo metanol sendo algumas vezes denominado de grau de metoxilação (DM – *Degree of Metoxilation*). As pectinas são subdivididas de acordo com o grau de esterificação. Pectinas de alto teor de metoxilação (ATM) apresentam DE superior a 50%, enquanto aquelas com valores de abaixo de 50% são conhecidas como pectinas de baixo teor de metoxilação (BTM) (BEMILLER, 1986; ROLIN; DE VRIES, 1990; THAKUR; SINGH; HANDA, 1997).

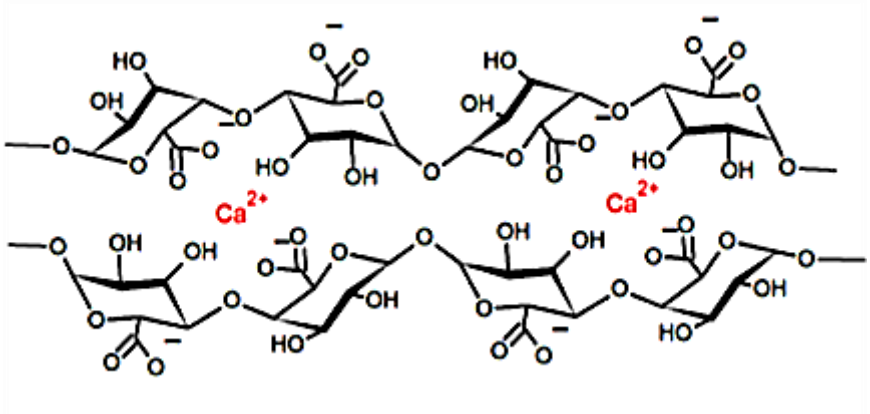
2.1.3 Estruturas tipo "*Egg-Box*"

O modelo da caixa de ovos "*egg-box*" foi proposto pela primeira vez em 1973 como uma teoria clássica descrever o mecanismo de gelificação dependente de íons de cálcio e a interação de grupos carboxila presentes nas cadeias poliméricas, alginatos e pectinas (GRANT et al., 1973). A gelificação descrita se apresenta em biopolímeros de alginato e pectina é e amplamente dependente em suas estruturas químicas, incluindo a porcentagem de ácido galacturônico (GalA), o peso molecular, o comprimento e a distribuição dos blocos de ligação ao Ca, ou o grau de metoxilação, acetilação e amidação (CAO et al., 2020). Se bem a formação estrutural dos "*egg-box*" é importante na gelificação, esta pode ser afetada por muitos fatores extrínsecos, como a concentração de polímeros e Ca^{2+}, formas de adição de Ca^{2+}, pH, temperatura, força iônica e a presença de co-solutos (LI et al., 2021). A conformação da estrutura tipo "*egg-box*"(Figura 4) é causada pela ligação cruzada entre pectina e Ca^{2+} com o GalA de duas cadeias de pectina ou alginato que sejam antiparalelos entre si produzindo formações geométricas regulares, onde Ca^{2+} seja incorporado através da coordenação com dez átomos epóxi dos açúcares (O1, O2, O3, O5', O6'), ou podem ter coordenações em apenas seis átomos de epóxi de açúcar (O2, O3, O6') mais um a três átomos de oxigênio de moléculas de água vão a estar envolvidos na coordenação (SUBRAMANIAM et al., 2021), coincidindo e demostrando que as duas cadeias de pectina/alginato antiparalelas exibem um desalinhamento axial de 1,7 Å, que consequentemente forma um dímero de caixa de ovo deslocado obtendo uma eficiência na associação com numerosos contatos de van der Waals, estas cadeias encaixam uma na outra, reduzindo a cavidade original e fornece duas sub-cavidades simétricas de tamanho apropriado para a ligação de um íon cálcio, consequentemente cria um eficiente sistema intermolecular periódico de rede de ligações de hidrogênio. Este último resultado sugere que as ligações de hidrogênio têm uma contribuição notável para a formação e estabilidade do hidrogel de pectina (BRACCINI; PÉREZ, 2001).

Este tipo de estruturas favorecem a conformação de *scaffolds* pois quando os íons de cálcio que se ligam com os grupos carboxila este se empacota de maneira tridimensional em forma de hélice criando assim uma rede reticulada que vão se organizando paralelas umas com outras (CAO et al., 2020). A conformação de *scaffold*, favorece a porosidade, moderada capacidade de absorção de água, excelentes

características mecânicas e excelente biocompatibilidade (SUBRAMANIAM et al., 2021).

Figura 4. Conformação estrutural de“Egg-Box”entre íons de cálcio e grupos carboxila



Fonte: Autoria Própria

2.2 Aplicação da pectina

As pectinas constituem um grupo de substâncias de grande interesse pela indústria alimentícia. Estes compostos são utilizados na forma de pó, como ingrediente de grande valor, devido a sua capacidade de gelificação. A pectina comercial ATM, vem sendo utilizada como agente gelificante na elaboração de geleias e compotas, agente espessante, floculante, estabilizador, em confecções de bebidas de frutas e dietéticas, em glacês e recheios de produtos de panificação, além de molhos para saladas, e substituto de gordura na produção de manteiga, margarina, patê, etc. (ROLIN; DE VRIES, 1990; THAKUR; SINGH; HANDA, 1997). A pectina de baixo teor de metoxilação (BTM) é utilizada na formulação de doces em massa de baixo valor calórico (*light*) (CHRISTENSEN; PECTINS, 1986). Além do uso em indústria alimentícia, a pectina tem aplicações na indústria farmacêutica. A pectina é um dos poucos polissacarídeos com atividade biomédica, consequentemente um candidato em aplicações biomédicas e de transportador de fármacos. Umas das aplicações biomédicas é como transportador de Probióticos de tipo *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia intestinalis* as quais juntamente com outras espécies do trato digestivo apresentam efeitos benéficos ao câncer de cólon e úlceras

gástricas. A ação da pectina é alimentar esses probióticos para que possam produzir metabólitos que inibem o crescimento e produção de elementos não probióticos (LIU et al., 2003). Além da atividade probiótica, a pectina também pode apresentar uma redução de intolerância à glicose em diabéticos, diminuindo inclusive o nível de colesterol no sangue. Pode ser causado pelo fato de que a viscosidade mais alta dos alimentos, causadas pelas fibras dietéticas, diminuem a velocidade de trânsito do trato gastrointestinal, obtendo a taxa de absorção intestinal de glicose mais baixa como resultado (TIAN; SINGH; SINGH, 2020). Em termos do efeito hipocolesterolemia, o uso de fibras alimentares (incluindo pectina) apresentaram redução dos níveis de colesterol; isso tem promovido sua aplicação para reduzir o risco de doença cardiovascular. Alguns estudos in vivo confirmaram que as características físico-químicas de pectina influenciaram o metabolismo do colesterol. Mais importante ainda, o estrutura química da pectina foi o principal fator que reduziu a níveis de colesterol no plasma e no fígado quando a pectina alto nível de metoxilação (HM) é consumida (ZHU et al., 2017).

O aproveitamento de galacturonan-II, um componente menor da pectina, desempenha um papel importante nas atividades da pectina como transportador de fármacos. A presença ubíqua de grupos hidroxila e carboxila na pectina contribui para sua hidrofobicidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade (LI et al., 2021). Cabe ressaltar que os dispositivos a base de pectina para uso de transporte de fármaco são reticulados, pois a reticulação especialmente com íons de Ca^{2+}, Zn^{2+}, entre outros, favorece a hidrofobicidade do material (LI et al., 2021) ajudando a que o hidrogel formado seja resistente a degradação proveniente da ingestão do fármaco, garantido que os sucos gástricos degradem essa cobertura mais lentamente e assim possa liberar a maior quantidade do fármaco, permitindo uma melhor interação do mesmo com o organismo (NOREEN et al., 2017).

2.3 Pectina como agente hemostático

No princípio, um primeiro estudo de interação da pectina com o sangue foi relatado como agente anticoagulante o qual foi descrito por Cipriani *et al*.(CIPRIANI et al., 2009) que reportaram a preparação e avaliação de um composto a base de pectina e heparina (anticoagulante normalmente presente nos tecidos do corpo humano) para tratamento de doenças tromboembólicas venosas, estudos avaliando o potencial coagulante da pectina, no melhor do nosso conhecimento, não são reportados nas literaturas cientificas e patentarias . No caso especifico do estudo de Cipriani *et al*., o

objetivo do estudo era a avaliação do emprego de biopolímeros naturais (pectina) sulfatados, como substitutos aos compostos sulfatados inorgânicos geralmente empregados, que oferecem um maior risco à saúde dos pacientes (CIPRIANI et al., 2009). O estudo demonstrou a compatibilidade biológica da pectina com a heparina, causando uma menor degradação dos vasos sanguíneos. Estes dados são encorajadores, pois a biocompatibilidade da pectina e o fato de que em contato com plasma sanguíneo não acarretou nenhuma contra indicação, apontam para a possibilidade de modulação desse biopolímeros para agir como agente hemostático que a princípio poderia promover uma rápida ativação da cascata de coagulação.

Levando-se em consideração que agentes hemostáticos a base de polímeros naturais tais como a quitosana, que age como um agente de agregação plaquetária pela interação de cargas e como fornecedor de fibrina (WEDMORE et al., 2006), a celulose que atua como agente de agrupação de células sanguíneas causado pela oxidação de seus radicais, fazendo assim um tampão plaquetário (SHEFA et al., 2019), e o alginato cuja estrutura pode ser comparada com a pectina, pois os dois polissacarídeos tem como radicais os grupos carboxila onde se forma as estruturas tipo "*egg-box*" junto com a interação de íons de cálcio (SIKORSKI et al., 2007), os quais no caso já reportado do alginato, fornece íon de cálcio na cascata de coagulação acelerando seu processo hemostático (WANG et al., 2017a).

Do anterior pode se antecipar que no caso do biopolímeros pectina essa ação hemostática poderia ser similar na reportada pelo alginato, mas a literatura cientifica, clínica e patentária na atualidade relata o uso de hemostáticos híbridos que usam a pectina junto com outros polímeros. Os biopolímeros de pectina para a preparação de agentes hemostáticos tópicos consistem em materiais híbridos nos quais o hidrogel de pectina é reticulado com diferentes polímeros (FARES et al., 2018; WANG et al., 2021). Pesquisando mais o fundo, não existe um agente hemostático baseado em pectina pura reticulada com quantidade diferente de Ca^{2+}.

Isso pode ser antecipado tomando-se como base o modelo de coagulação molecular, olhando como base as estruturas tipo "*Egg-box*" pois como foi descrito na cascata de coagulação, o cálcio tem um papel importantes na modulação da cascata de coagulação e estas estruturas podem providenciar esses íons mais rapidamente, com o qual poderia acelerar o processo para a via normal da cascata.

Se bem foi reportado anteriormente pela patente número **WO 01/82937 A1**, do nome c*omposições hemostáticas de poliácidos e óxidos de polialquileno e métodos para seu uso* (WILLIAM; STEPHANIE; HERBERT, 2006), descreveu a ideia de obter diferentes tipos de agentes hemostáticos a base de biopolímeros, ressaltando entre sua proposta, a funcionalização hemostática dos materiais com trombina para que atuem rapidamente tanto na via extrínseca como intrínseca, promovendo a formação de fibrina.

Estas propostas tanto da patente (**WO 01/82937 A1**), na qual apresenta ideias apenas, do que seriam agentes hemostáticos baseados em polissacarídeos incluindo a pectina, quanto a publicação do Wang *et al*.(WANG et al., 2021), que apresenta a ação hemostática de um produto baseado em pectina, mostram propostas de desenvolvimento de agentes hemostáticos híbridos baseados em pectinas, mas não descrevem a ação hemostática da pectina como agente principal.

3. TÉCNICAS FISICO-QUÍMICAS DE CARACTERIZAÇÃO

3.1 Difração de Raios-x

A difração de raio-X (DRX) é um método utilizado na determinação da cristalinidade de compostos. Este possibilita a confirmação da identidade cristalina, diferenciação de materiais cristalinos ou amorfos e a quantificação da percentagem de cristalinidade de amostras. A análise DRX é baseada na interferência construtiva de raios-X monocromáticos e da amostra a estudar(PAIXÃO, 2018). As interações entre os raios emitidos e a amostra produzem uma interferência construtiva quando é satisfeita a Lei de Bragg:

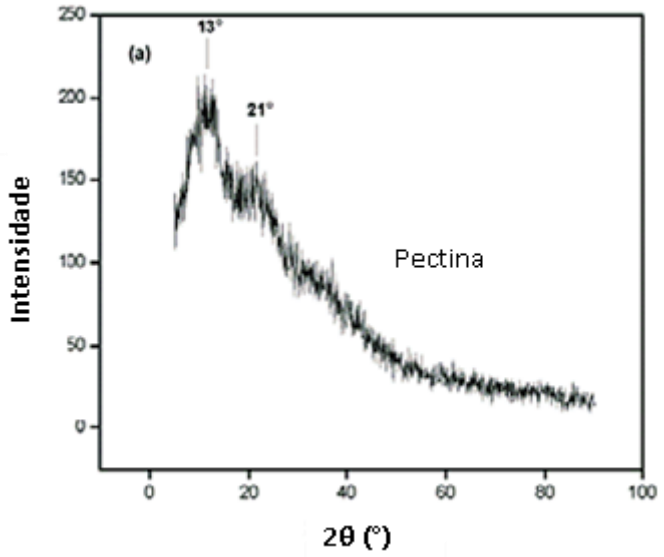
$$n\lambda = 2d\ sen\theta \qquad \textbf{\textit{Equação 1}}$$

Onde n é a ordem de reflexão, λ o comprimento de onda, d a distância entre planos de reflexão e θ o ângulo de incidência dos raios-X na amostra.

No caso de materiais amorfos ou aqueles cuja rede primitiva não está definida, os difratogramas são definidos por meio de proeminências onde pequenos grupos cristalinos

da rede tentam se organizar (Figura 6) Os biopolímeros geralmente são homopolímeros ou contêm blocos de homopolímero. Estas moléculas ou segmentos regulares têm uma tendência geral a cristalizar, mas formam apenas pequenos domínios cristalinos devido à baixa mobilidade da molécula. Quando a densidade eletrônica é periódica, sua transformada de Fourier mostra picos discretos correspondentes a difração. Picos agudos não podem ser facilmente identificados numa rede biopolimérica, mas a agrupação do anéis de glucose sim (NISHIYAMA; MIRIAM; LIMA, 2013). Esta agrupação é identificada dentro da faixa dos 13° e os radicais ou grupos funcionais, se identificam na faixa dos 21°. Na figura 6 é mostrado um exemplo de um difratograma de uma amostra de pectina evidenciando os picos característicos de um biopolímeros.

Figura 5. Exemplo de difratograma do biopolímeros de Pectina



Adaptado de: (MANJULADEVI et al., 2018)

Os padrões de DRX das partículas sintetizadas foram coletados utilizando um difratômetro Rigaku MiniFlex II (Tokio, Japan) com uma fonte de ânodo rotativo com ;uma placa plana na geometria de Bragg-Brentano, operando com radiação Cu-Ka comprimento de onda = 1.5418 Å) em 40 kV e 15 mA, e equipado com um

monocromador de grafite. Os padrões de difração em pó foram registrados na faixa de 2θ = 3–50° com um passo de digitalização de 2° (2θ) min^{-1} e uma taxa de 10 s/step.

3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

O MEV é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Ele é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas. Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo (ABDULLAH; MOHAMMED, 2019). O princípio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. O sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação. A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento de tungstênio (W) aquecido, operando numa faixa de tensões de aceleração de 1 a 50 kV (ABDULLAH; MOHAMMED, 2019).

Complementarmente, a causa da quantidade de elétrons que ficam dispersados por causa da emissão, existe uma técnica chamada de energia dispersiva de raios X (EDX ou EDS) a qual é uma técnica de análise elementar associada à microscopia eletrônica de varredura, baseada na geração de raios X próprias das interações dos elétrons emitidos, o qual caracteriza qualitativa e quantitativamente a presença de elementos químicos presentes nas amostras analisadas pelo MEV(ABDULLAH; MOHAMMED, 2019)

As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram registradas utilizando os instrumentos FEI Magellan 400 L e Philips XL-30 FEG, ambos acoplados a analisadores de energia dispersiva de raios X (EDS), e operando com um feixe de elétrons regulável para tensões de 5 a 10 kV. Antes das análises, um revestimento fino de

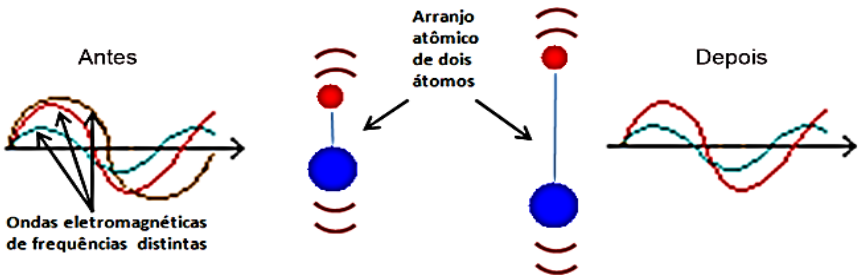
ouro foi depositado sobre as amostras. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa).

3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR)

Espectroscopia de infravermelho é o conjunto de técnicas que faz uma avaliação físico-química do material de interesse através da transmissão, absorção ou reflexão de uma onda eletromagnética incidente sobre o material a ser estudado, sendo assim, as técnicas espectroscópicas são úteis para obter informações sobre os tipos de ligações entre átomos e vizinhança atômica desses átomos assim como a presença e a concentração de substâncias em amostras (LEITE; PRADO, 2012; ROBERT M. SILVERSTEIN, FRANCIS X. WEBSTER, 2005)

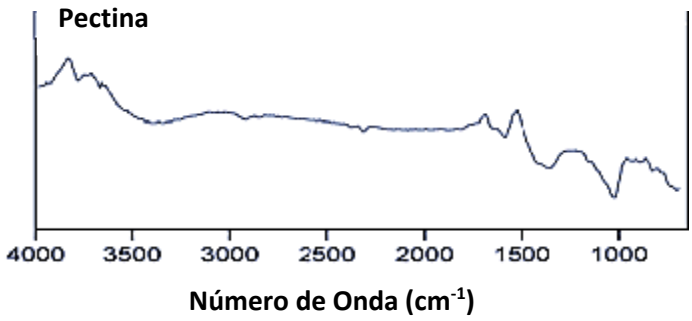
Existe um tipo em especial de espectroscopia para estudo de sólidos, que é a espectroscopia de infravermelho e este experimento consiste em emitir ondas eletromagnéticas de comprimento na faixa do infravermelho (1nm a 700 nm)(LEITE; PRADO, 2012) sobre o material a ser estudado, a energia da radiação do infravermelho é capaz de excitar as vibrações dos núcleos dos átomos (figura 7) que compõe a amostra sem afetar a dinâmica natural dos elétrons em torno do núcleo, como cada molécula possui vibrações moleculares específicas, pode-se então, montar espectros referentes aos comprimentos de onda que foram ou o que não foram absorvidos. Na Figura 8, mostra um exemplo de um espetro infravermelho de uma Pectina mostrando que essas vibrações moleculares da amostra pode identificar quais são os elementos químicos que compõe a amostra e como eles estão ligados entre si sendo identificadas pelo um único número de onda para cada elemento identificado que possui a amostra (LEITE; PRADO, 2012; ROBERT M. SILVERSTEIN, FRANCIS X. WEBSTER, 2005; ROBERT, 2015)

Figura 6. Excitação das ligações químicas através de absorção de ondas eletromagnéticas



Fonte: (LEITE; PRADO, 2012).

Figura 7. Exemplo de Espetro Infravermelho (FT-IR) típico de uma Pectina



Adaptado de : (MANJULADEVI et al., 2018)

Os espectros FT-IR foram obtidos utilizando pastilhas de KBr contendo cerca de 10% em peso da amostra, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1}, com resolução de 4 cm^{-1}, e média de 64 varreduras. Os espectros de FTIR foram coletados por meio de espectrômetro SHIMADZU (IRTracer-100).

3.4 Microscopia de Contraste de Fase

Quando a luz é usada para sondar um material, informações relevantes podem ser transportadas tanto pela amplitude quanto pela fase. Quando a luz atravessa a matéria, ela é impressa com informações sobre as propriedades do material através de seu índice de

refração complexo (PALIMA; GLÜCKSTAD, 2010). O componente imaginário e o índice de refração contribuem para a absorção e afeta a intensidade da luz enquanto o componente real diminui a propagação da onda e causa um atraso de fase. Portanto, tanto a intensidade quanto a fase da luz são codificadas com informações relevantes sobre as propriedades do material(LOVITT; WRIGHT, 2014) já seja para um meio homogêneo, a fase pode transportar informações topográficas relevantes sobre a amostra. Enquanto apodização da intensidade necessariamente implica perdas de energia, a codificação de fase é inerentemente sem perdas, o que torna este último adequado mesmo em condições de pouca luz (PALIMA; GLÜCKSTAD, 2010). A pesar das ajudas eletrônicas as informações da fase permanecem ocultas de câmeras e detetores de luz sensíveis, os quais reúnem informações de intensidade.

O microscópio de contraste de fase é um instrumento que converte diferenças do índice de refração que não podem ser vistas, em diferenças de intensidade que se tornem visíveis. As ondas de luz que atravessam os componentes celulares de densidades ópticas diferentes assim o farão em diferentes velocidades. Desse modo, as ondas luminosas que atravessam núcleos, mitocôndrias e inclusões celulares emergirão em tempos diferentes e em fases diversas, de um elemento em relação ao outro (LOVITT; WRIGHT, 2014; PALIMA; GLÜCKSTAD, 2010)

As imagens de contraste de fase foram obtidas usando-se um microscópio ótico BX60 (Olympus, Nova York, SA). Nestas análises, foram depositados 170 µL de volumes de sangue carneiro da raça Santa Inês (*Ovis aires*), coletados em tubos contendo citrato de sódio (4% v/v), depositados em lâminas de microscópio de vidro. Em seguida, 10 µL de solução aquosa de 0,2 M de $CaCl_2$ foi adicionado ao sangue para reverter o efeito anticoagulante causado pela quelação de cálcio. Em seguida foram, foram cortados filmes em dimensões de 1 cm x 1cm sem reticulação (filme não “cross-linkados”) e reticulados (“cross-linkados”) com 0,5%, 1,5 %, 3% e 5% de Cálcio (Ca^{2+}), e cada filme depositado sobre a lamina de microscópio com 0,1 µL de água, ao mesmo tempo foram depositados sobre a superfície do filme 2 µL de sangue, e as imagens foram coletadas em intervalos de tempo de 0, 2, 4 min, e a interação das hemácias com os filmes hemostáticos foram observadas *in situ*. Um segundo conjunto de dados foi coletado usando 20 µL de sangue depositando sobre os filmes hemostáticos e as imagens foram coletadas em intervalos de tempo de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 min com a finalidade de observar-se a possível ocorrência de movimento Browniano das moléculas nos filmes

hemostáticos e as modificações estruturais decorrentes dessas interações..Os experimentos foram realizados no Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises Ibilce/Unesp- Campus de São José do Rio Preto

3.5 Estudos Térmicos via Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

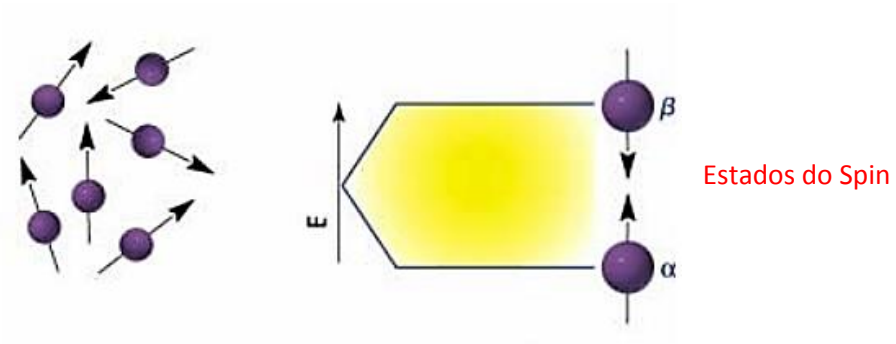
A Calorimetria Diferencial de Varredura é uma técnica na qual a taxa do fluxo de calor (potência) de uma amostra é monitorada em função do tempo ou da temperatura enquanto a temperatura desta amostra, em uma atmosfera específica, é programada, para determinar a entalpia do sistema (SPINK, 2008), obtendo assim um perfil térmico da amostra, na qual por meio desta, pode se identificar fenômenos exotérmicos e endotérmicos da mesma, sendo possível observar variações positivas e negativas do fluxo de calor. A taxa na qual o sinal do fluxo de calor se altera está relacionado ao desempenho térmico da amostra e a área do pico sobre a taxa de calor versus a curva do tempo está relacionada ao calor de dessorção, assim sendo, durante a corrida do aquecimento a posição da linha base depende da taxa de aquecimento e da diferença do calor específico da amostra e da referência (ISLAM SARKER et al., 2013). Portanto, para se obter o calor de dessorção da amostra a ser estudada pode-se fazer a integral dos pontos da linha de base e subtrair a integral dos pontos na curva de transição de fase ou de uma outra forma podemos ajustar a linha tangente nas curvas de transição de fase e pelo coeficiente da reta obter o valor da entalpia de ligação (G. HÖHNE; W. HEMMINGER; H.-J. FLAMMERSHEIM, 1996; MULLER; HAKVOORT; JANSEN, 2004).

As análises de DSC dos filmes hemostáticos a base de pectina (PEC-PEG-Ca-0.5 PEC-PEG-Ca-3.0 e PEC-PEG-Ca-5.0) foram realizadas usando-se um calorímetro PerkinElmer® DSC 6 (PerkinElmer, Massachusetts, EUA). As amostras (cerca de 4 mg) foram pesadas com precisão em uma panela de alumínio aberta e aquecidas de 20 ° C a 400 ° C a uma taxa de varredura de 10°C / min sob um fluxo de nitrogênio de 20 mL / min. As investigações de DSC foram realizadas em materiais de partida, pectinas puras. As transições de primeira e segunda ordem dos materiais foram obtidas a partir das curvas registradas.

3.6 Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido rotação em torno do Ângulo Mágico (^{13}C RMN-MAS)

A espectroscopia de RMN foi desenvolvida no final da década de 1940 para estudar os núcleos atômicos. Em 1951, os químicos descobriram que a espectroscopia de ressonância magnética nuclear poderia ser usada para determinar as estruturas de compostos orgânicos. Esta técnica espectroscópica pode ser usada apenas para estudar núcleos atômicos com um número ímpar de prótons ou nêutrons (ou ambos). Esta situação ocorre nos átomos de ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F e ^{31}P(UNIVERSIDAD DE VALENCIA, 2011). Esse tipo de núcleo é magneticamente ativo, ou seja, possui spin, assim como os elétrons, pois os núcleos possuem carga positiva e possuem um movimento rotacional em torno de um eixo que os faz se comportar como se fossem pequenos ímãs(BALCI, 2005). Na ausência de um campo magnético, os spins nucleares se orientam aleatoriamente. No entanto, quando uma amostra é colocada em um campo magnético, como mostra a figura 8, os núcleos com spin positivo são orientados na mesma direção do campo, em um estado de energia mínima chamado estado de spin α, enquanto os núcleos com spin negativo spin são orientados na direção oposta à do campo magnético, em um estado de maior energia chamado estado β-spin(BALCI, 2005; UNIVERSIDAD DE VALENCIA, 2011).

Figura 8: Estados de orientação do spin baixo a ação do campo magnético



Fonte: Adaptado de (UNIVERSIDAD DE VALENCIA, 2011)

Existem mais núcleos no estado de spin α do que no estado β, mas embora a diferença populacional não seja grande, é suficiente para estabelecer a base para a espectroscopia de RMN. A diferença de energia entre os dois estados de spin α e β depende da força do campo magnético aplicado H_0. Quanto maior o campo magnético, maior a diferença de energia entre os dois estados de spin(E. BRETMAIER, 1995).

Quando uma amostra contendo um composto orgânico é brevemente irradiada por um pulso intenso de radiação, os núcleos no estado α-spin são promovidos ao estado β-spin. Esta radiação está na região de radiofrequência (rf) do espectro eletromagnético, razão pela qual é chamada de radiação rf. Quando os núcleos retornam ao seu estado inicial, eles emitem sinais cuja frequência depende da diferença de energia (ΔE) entre os estados de spin α e β. O espectrômetro de RMN detecta esses sinais e os registra como um gráfico de frequência em função da intensidade, que é chamado de espectro de NMR. O termo ressonância magnético nuclear vem do fato de que os núcleos estão em ressonância com a radiofrequência ou radiação de rf(E. BRETMAIER, 1995; UNIVERSIDAD DE VALENCIA, 2011).

Na espectroscopia de RMN de ^{13}C em estado sólido, os núcleos de ^{13}C encontrados em diferentes estruturas são diferenciadas umas das outras com base em valores de deslocamento químico geralmente cotado em termos de partes por milhão (ppm) do campo magnético do espectrômetro. Sob condições ideais, a intensidade total do sinal adquirido em um análise de ^{13}C RMN é uma função da quantidade de carbono contida na amostra. Portanto, a composição da fração orgânica de um solo pode ser estimada por expressar a intensidade de um sinal como uma fração de toda a intensidade do sinal adquirida(BALCI, 2005; E. BRETMAIER, 1995).

A grande variedade de estruturas orgânicas encontradas em materiais orgânicos naturais e a linhas inerentemente amplas associadas à análise de ^{13}C RMN em estado sólido resultam em uma sobreposição de sinais adjacentes e a produção de bandas largas de intensidade de sinal. Como resultado, normalmente não é possível identificar tipos individuais de carbono e a intensidade espectral é integrada em regiões de deslocamento químico dentro das quais os sinais são derivados de tipos semelhantes de carbono(BALDOCK et al., 1997).

A técnica ^{13}C é usada para deduzir a estrutura do esqueleto de carbono observando os ambientes magnéticos dos átomos de hidrogênio, determinando o ambiente magnético dos átomos de carbono. Aproximadamente 99% dos átomos de carbono em uma amostra natural são do isótopo ^{12}C. Este isótopo tem um número par de prótons e um número par de nêutrons, portanto, não possui spin magnético e não pode dar origem a sinais de ressonância magnética nuclear. O isótopo ^{13}C menos abundante tem um número ímpar de nêutrons, dando-lhe um spin magnético de 172, igual ao do próton. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C é menos sensível que a de ^{1}H porque apenas 1%

dos átomos de carbono têm spin e, além disso, a frequência de ressonância de ^{13}C, para um determinado campo magnético, é a quarta parte da qual é dada por ^{1}H RMN(BALCI, 2005; BALDOCK et al., 1997; E. BRETMAIER, 1995).

Os deslocamentos químicos do carbono são 15 a 20 vezes maiores do que os do hidrogênio porque o carbono está diretamente ligado a átomos que estão protegendo ou desprotegendo. Por exemplo, o próton de um aldeído absorve a 9,4 ppm no espectro ^{1}H enquanto o carbono carbonílico absorve a 180 ppm no espectro ^{13}C. Além disso, os sinais no espectro ^{13}C são linhas verticais, ou seja, não há divisões spin-spin. Isso ocorre porque apenas 1% dos átomos de carbono entram em ressonância e, portanto, há uma probabilidade muito pequena de que um núcleo ^{13}C seja adjacente a outro núcleo ^{13}C(BALCI, 2005; E. BRETMAIER, 1995).

Os dados de ^{13}C RMN-MAS foram coletados no Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP)em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Eduardo de Azevedo. Os dados coletados por meio de um espectrômetro Varian Inova (Varian, Palo Alto, CA, EUA) operando nas frequências de 100,5 MHz e 400,0 MHz para ^{13}C. Uma sonda Jackobsen de ressonância dupla de 7 mm com sistema pneumático de rotação da amostra construída em torno da sonda giratória de ângulo mágico com estabilidade de frequência superior a 2 Hz foi usada para a coleta de dados. A sequência de pulso CPMASTOSS (polarização cruzada em rampa sob rotação de ângulo mágico e supressão total de bandas laterais de rotação) permite a integração de excitação por polarização cruzada (CP) entre os núcleos ^{1}H e ^{13}C com uma rampa de radiofrequência, rotação de amostra em torno do ângulo mágico (MAS: giro em ângulo mágico), eliminação de bandas laterais (TOSS: supressão total de bandas laterais em giro) e desacoplamento heteronuclear do canal ^{1}H, que resultou na aquisição de um espectro ^{13}C ssNMR de alta resolução. Todos os experimentos de ^{13}C ssNMR foram realizados conforme descrito na literatura Rezende et al. (REZENDE et al., 2011)**.** A frequência de MAS foi de 6 kHz e os comprimentos de pulso de 90 ° foram 4,5 e 4,0 μs, para ^{13}C e ^{1}H, respetivamente. A polarização cruzada foi alcançada com amplitude de RF em rampa (80-100%) usando um tempo de contato de 1 ms. O desacoplamento heteronuclear com modulação proporcional de fase (TPPM) foi realizado com uma frequência de desacoplamento de 60 kHz. Todas as medições ^{13}C ssNMR foram realizadas usando atrasos de reciclagem de 5 s.

3.7 Absorção de água e sangue dos polímeros hemostáticos à base de pectina

Os experimentos de absorção foram baseados no trabalho de Pasini *et al* (PASINI CABELLO et al., 2015) fazendo-se as modificações necessárias para os estudos com as moléculas de sangue (hemácias). Uma área de 1 cm^2 de cada filme foi seca em um forno a 45°C por 24 h. O filme seco foi pesado com precisão (*weight dried*= Wd) e imerso em um frasco (placa de petri) contendo 20 mL de água destilada a 25ºC. Os filmes (PEC-PEG-Ca-1, PEC-PEG-Ca-3.0 e PEC-PEG-Ca-5.0) as superfícies desses filmes foram postas em contato com a superfície da água por 20 segundos, em seguida foram retirados, o excesso de água foi cuidadosamente retirado com lenços de papel e devidamente pesados (*wet weight*= Ww_{20}). O mesmo procedimento foi repetido, porém agora o tempo de exposição ou contato entre a superfície dos filmes e a água foi de 60 segundos (wet weight= Ww_{60}). Um outro conjunto de dados experimentais foram obtidos usando-se o mesmo procedimento, porém agora usando sangue de carneiro da raça Santa Inês (*Ovis aires*). Nesse caso, foram empregados 10 ml de sangue tratados com 0.5 mL de $CaCl_2$ (0.2M) à temperatura de 37ºC (temperatura do sangue no organismo do animal) e o tempo de exposição entre as superfícies dos filmes hemostáticos e o sangue foram de 20 e 60 segundos.

Todos os ensaios experimentais foram realizados em triplicado. O índice de absorção foi determinado pela seguinte equação:

$$\%Abs = \left(\frac{w_w - w_d}{w_d}\right) 100 \quad \text{(Equação 1).}$$

3.8 Análises Tromboelastograficos (TEG)

A tromboelastografia (TEG) foi um método desenvolvido em 1948 por Harter na Alemanha e passou a ser utilizado na prática clínica a partir de 1980. Atualmente, o TEG é utilizado predominantemente por hematologistas e anestesiologistas durante cirurgias, como transplantes, cirurgias cardíacas, obstétricas e na monitoração de pacientes de trauma quanto a necessidade de transfusão sanguínea (MOURA; BRAGA, 2017). Esta técnica consiste em avaliar a adesividade, elasticidade e outras propriedades do sangue da perspetiva global e dinâmica da coagulação. O TEG prevê condições Hipo coagulantes e Hiper coagulantes e pode ser utilizado para avaliar alterações de fatores coagulatórios

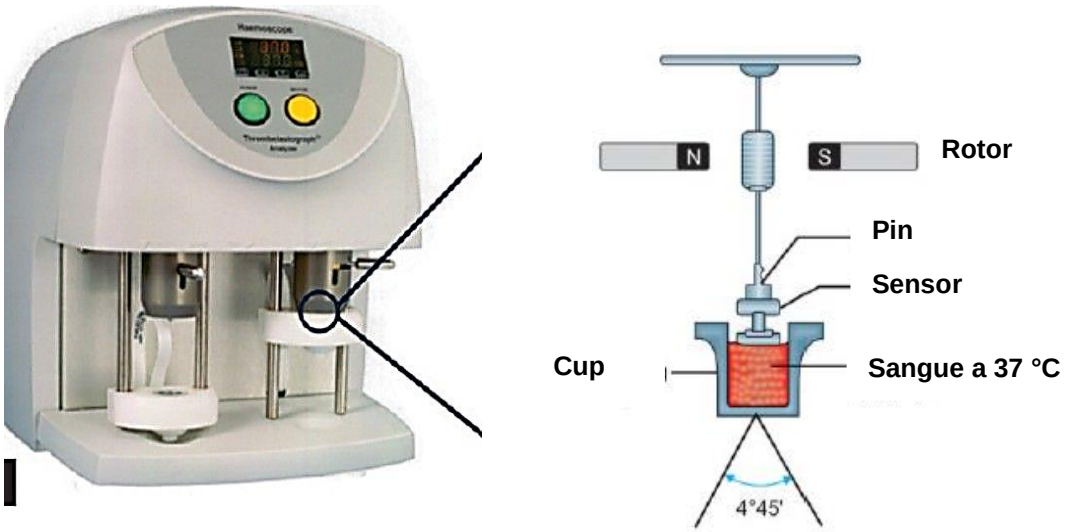
(KATSARAS et al., 2021).

Na técnica de tromboelastografia permite avaliar as propriedades elásticas do sangue fornecendo uma avaliação global da função hemostática. As alterações que ocorrem durante a coagulação são registradas, fornecendo uma representação gráfica do processo de polimerização da fibrina e também da força do coágulo(BOLLIGER; SEEBERGER; TANAKA, 2012). Um dos diferenciais deste teste em relação aos ensaios de coagulação de rotina, tais como TTPA (tempo de tromboplastina parcial ativada) e TP (tempo de protrombina) é que o TTPA e o TP não são executados em sangue total; em vez disso, estes testes são realizados apenas no plasma. Assim, a contribuição de plaquetas para a resistência e formação do coágulo não são considerados. Enquanto TP e o TTPA são frequentemente testes adequados para distúrbios de coagulação do sangue e medicações utilizados para tratar estas desordens de monitoramento, eles fornecem uma visão simplista das características globais da coagulação (TRAPANI, 2013).

O sangue fresco deve ser obtido de cateter central ou artéria para um tubode citrato (CHARLES W. WHITTEN, M.D.; PHILIP E. GREILICH, 2000). Um volume de 340 µl de sangue é colocado num copo, onde é introduzido um pino e o copo gira de forma oscilante a 4º45" a cada 10 segundos. Uma força tensional é transmitida ao pino, que decodifica eletronicamente as propriedades da formação do coágulo, medindo a sua resistência ao longo do tempo até a lise (Figura 10) .

A Figura 10 mostra o princípio de funcionamento do instrumento TEG. O equipamento possui 2 canais; para cada canal, um pino suspenso por um fio de torção é imerso no sangue total em um recipiente de plástico (cup). O cup oscila a uma velocidade constante em um ângulo de 4° 45’, seis vezes por minuto para imitar o fluxo venoso lento e ativar a coagulação 100. O torque do cup é transmitido para o pino através da formação das cadeias de fibrina dos coágulos conforme a coagulação prossegue, e transmitido para o fio de torção para a conversão de um transdutor elétrico-mecânico num sinal elétrico, que pode ser monitorado por um computador (LAURENTI, 2017)

Figura 8. Imagem ilustrativa do princípio de funcionamento do equipamento Tromboelastógrafo Haemoscope modelo 5000



Adaptado e modificado de: (HAEMONETICS CORPORATION, 2011; THAKUR; AHMED, 2012)

O equipamento irá fornecer os seguintes parâmetros de coagulação

1) Tempo de reação: caracterizado como R, é o tempo de formação de um coágulo reconhecível com tamanho de aproximadamente 2 mm, início da produção de fibrina, além indica a velocidade da geração detromboplastina e a funçãodos fatores XII, XI e VIII.O tempo curto indica presença de hipercoagulabilidade (THAKUR; AHMED, 2012);

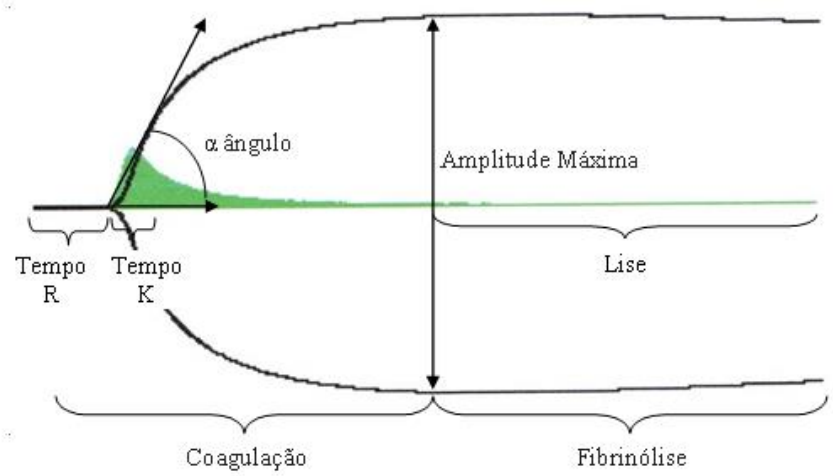
2) Tempo de coagulação: caracterizado como K, este parâmetro equivale ao tempo que se inicia a partir de R e se prolonga até o coágulo atingir 20 mm, este parâmetro mostra a formação de um coágulo relativamente firme; este parâmetro indica o tempo de início de formação de fibrina, demonstrando a formação de um coágulo relativamente firme, relacionando a função da via intrínseca entre as plaquetas e fibrinogênio. Quando o tempo é curto indica um aumento da atividade plaquetária (MOURA; BRAGA, 2017);

3) Ângulo α (alfa): inclinação entre R e K, representa a taxa de geração de trombina e a conversão de fibrinogênio em fibrina, demonstrando a rapidez ou cinética de formação de fibrina, ou de um coágulo sólido. Indica, também, a qualidade das plaquetas e do fibrinogênio (GALVEZ C.; CORTES L., 2012);

4) MA, maior amplitude ou amplitude máxima, reflete a máxima propriedade elástica da fibrina e adesão plaquetária. O valor aumenta de acordo com qualidade de plaquetas, indicando a interação entre o fibrinogênio e fator VIII. Fundamenta-se na interação de fibrina e plaquetas (MOURA; BRAGA, 2017);

A Figura 11. mostra e exemplo de um. Tromboelastograma de uma amostra de sangue em parâmetros médicos normais, obtido depois do processamento dos dados pelo software do TEG ®, onde mostra a ordem e sequência dos parâmetros principais descritos anteriormente.

Figura 9. Exemplo de Tromboelastograma



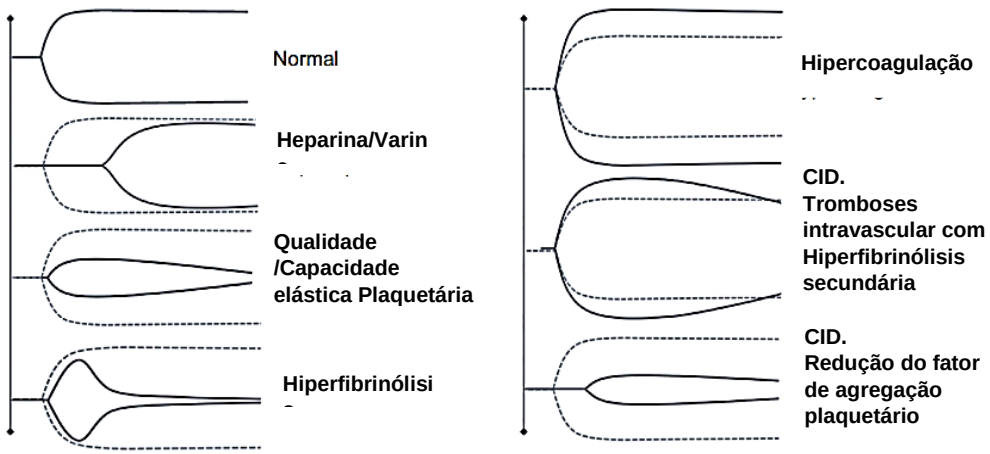
Fonte: (MOURA; BRAGA, 2017)

A variação desses parâmetros estabelece a tendencia do tromboelastograma, determinando assim 6 efeitos principais que estabelecem os efeitos hemostáticos das amostras sometidas no sistema. A Figura 12 mostra os tipos de tromoboelastogramas e qual é a relação entre a tendencia e o fenômeno de coagulação, tanto como hemostáticos

como anticoagulantes, pois o TEG em princípio é uma técnica que determina doenças relacionadas com o sangue (CHARLES W. WHITTEN, M.D.; PHILIP E. GREILICH, 2000). No lado esquerdo da figura 3 apresenta os traçados de fenômenos relacionados a problemas de coagulação, formação ou detecção de Heparina e Varina os quais induzem a uma tromboses aguda(SANTANA et al., 2017), assim mesmo pode determinar a qualidade e capacidade elástica do coagulo (TRAPANI, 2013) e as tendencias de hiperfibrinólise onde se indica uma atividade fibrinolítica aumentada o qual gera um sangramento continuo no sistema pois a acelerada geração unicamente de fibrina no sistema prejudica drasticamente o processo de coagulação (POHLMAN; FECHER; ARREOLA-GARCIA, 2018).

Em contraste, o lado direito da figura 12 mostra as tendencias dos traçados para fenômenos hemostáticos comparados com um traço normal, onde podem se apresentar descrições hiper coagulantes onde a produção de fibrina e trombina aumentam simultaneamente levando ao sistema mais rápido à via comum da cascata de coagulação(GALVEZ C. et al., 2010), assim mesmo descreve sistemas de coagulação intravascular disseminada (CID) onde os ativadores de plasmogenias (TPa) ativam a via intrínseca da cascata a qual promove a geração da trombina (TPAI) ajudando assim na produção de fibrina para que a matriz de contenção coagular seja rapidamente produzida, pelo último pode se indicar a força de coagulo ou a redução do fator de agregação plaquetária (MARINHO, 2021).

Figura 10. Apresentação esquemática de diferentes Tromboelastogramas refletindo diferentes estados do sistema de coagulação em comparação com uma medida normal



Adaptado de: (POHLMAN; FECHER; ARREOLA-GARCIA, 2018)

Este método é útil no diagnóstico precoce de coagulopatias, como hipercoagulabilidade, hipercoagulabilidade, hiperfibrinólise e alterações da função plaquetárias de pacientes com trauma (MOURA; BRAGA, 2017). A aplicação e o desenvolvimento deste método de análise de sangue evoluíram fortemente baseados nas necessidades do anestesista moderna. Assim sendo, este equipamento apresenta muitas aplicações, como por exemplo: controle de parâmetros da coagulação sanguínea no transplante de fígado, cirurgia de *bypass* cardiopulmonar, obstetrícia, cardiologia e pediatria sendo que a aplicação na área de trauma é muito importante devido a sua capacidade de avaliar o sangue total. O TEG é ideal para identificar rapidamente os pacientes com coagulopatias aguda traumática e posteriormente, ativar os protocolos de transfusão maciça para estes pacientes mais rapidamente (LAURENTI, 2017) .

As análises tromboelastográficas dos materiais baseados em Pectina foram realizadas com um Tromboelastógrafo Haemoscope modelo 5000 (TEG), através do qual foi possível determinar os parâmetros *in vitro* de coagulação (R, K, α, MA) dos materiais hemostáticos testados utilizando sangue coletada em tubos tratados com citrato de sódio.

Um exemplo típico de uma análise tromboelastrografica baseado nos procedimentos de Laurenti *et al*.(LAURENTI, 2017) e seguida das modificações necessárias é apresentada abaixo:

a) **Preparação do ensaio "Controle":** O processo foi iniciado com um ensaio "Controle" o qual foi preparado inserindo no recipiente de amostra (cup) do TEG 20 μL de $CaCl_2$ 0,2 M e adicionado 340 μL de sangue total estabilizado, este procedimento serve para repor os íons de cálcio quelados pelo citrato e para a restauração da atividade de coagulação do sangue. Este procedimento foi utilizado como passo inicial para todas as medições tromboelastográficas descritas neste trabalho.
b) **Ensaio hemostático usando amostra comercial "QuickClot":** Em um experimento típico, 0,5 mg do material hemostático comercial *QuickClot* previamente pulverizado, foi introduzido diretamente no recipiente de amostra (cup) contendo o sangue total citratado com a solução de cálcio conforme descrito

no passo a). O *Quickclot* foi utilizado com um padrão comercial de referência para comparação a da ação hemostática dos filmes pectinas preparadas nesse estudo.

c) **Preparação dos ensaios dos filmes de Pectina:** Para este experimento já com o sangue total citratado dentro do cup de acordo a descrição do ponto a), filmes de **PEC_PEG, PEC_PEG_Ca-0,5, PEC_PEG_Ca-3** e **PEC_PEG_Ca-5,** respectivamente foram cortados em quadrados de dimensões de 0,3 mm de largura e 0,25 mm de lado e 0,11 mm de espessura obtendo uma massa média de entre 0,20 mg e 0,22 mg. As análises foram realizadas em triplicatas e em três eventos independentes. As alterações viscoelásticas que ocorrem durante a coagulação foram registradas, fornecendo tromboelastrogramas que foram analisados e discutidos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

O objetivo principal do projeto de pesquisa é a preparação de novos agentes hemostáticos tendo como matriz principal o biopolímeros pectina, sua completa caracterização tromboelastrografica e o estudo *in vitro* desses novos agentes hemostáticos em potenciais aplicações cirúrgicas e odontológicas.

4.1.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do projeto em etapas a serem desenvolvidas estão descritas abaixo:

Etapa 01- Preparação dos agentes hemostáticos: Nessa etapa do projeto foram preparados agentes hemostáticos a base de pectina. A preparação dos agentes hemostáticos a base de pectinas será feita através de modificações dos procedimentos sintéticos reportados na literatura. O método foi uma adaptação do método de *cross-linking* por difusão baseado no procedimento experimental descrito por Rezvanian *et al*.(REZVANAIN et al., 2017).

Etapa 02 - Caracterização físico-química dos agentes hemostáticos: Na etapa 2 foi executada a caracterização físico-química dos biopolímeros preparados na etapa 1. Os agentes hemostáticos serão caracterizados por difração de Raios-X (DRX). Os dados de DRX permitirão evidenciar detalhes da estrutura molecular dos compostos sintetizados. A caracterização morfológica será feita por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG). As análises serão feitas no LNNano (Laboratório Nacional de Nanotecnologia-Campinas-SP). Analises estrutural por ^{1}H-NMR, ^{13}C-CP-MAS-NMR para caracterização estrutural dos biopolímeros em complementação aos dados de DRX. Análises térmicas foram feitas mediante a técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) para analisar o comportamento estrutural térmico dos filmes em geral. Análises *in vivo* foram feitos para determinar a interação das hemácias com os filmes a base de pectina e a determinação de sua ação hemostática. Microscopia de contraste possibilitou a observação da interação das hemácias na superfície e o ordenamento das mesmas dentro da rede polimérica. A tromboelastografia (TEG) determinou o processo hemostático dos filmes a base de Pectina, ajudando a determinar sua ação hemostática.

Etapa 03 - Estudos tromboelastograficos dos agentes hemostáticos in vitro: A etapa 3 do projeto estará focada na determinação das características hemostáticas dos agentes hemostáticos a base de pectina e sua performance em comparação com o agente hemostático comercial *Quick Clot*. Essa etapa foi fundamental pois por meio desses estudos os parâmetros (R, K, α, MA) foram determinados por análise tromboelastografica. Dentre estes fatores, destaca-se o fator R (tempo de formação de um coágulo reconhecível com tamanho de aproximadamente 2 mm) e MA (propriedade elástica da fibrina e adesão plaquetária) como os mais relevantes na cascata de coagulação, e espera-se que os compostos a base de pectina tenham ação igual ou superior ao *Quick Clot*, neste caso. Nessa etapa do desenvolvimento do projeto, os estudos in vitro serão feitos utilizando sangue de carneiro estabilizado com citrato obtido do Hospital Veterinário do Centro Universitário de Rio Preto-UNIRP, e o estudo será conduzido de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa Animal-UNIRP.

5. MATERIAS É MÉTODOS

Foram utilizadas nessa etapa de execução do projeto de pesquisa os seguintes reagentes: pectina (extraída de casca de citros, ácido galacturônico ≥ 74%, 19500 gr / mol, Aldrich, etanol absoluto ACS ≥ 99,5% (Sigma-Aldrich) ,Cloreto de cálcio ($CaCl_2$) desidratado≥ 99%, Sigma-Aldrich), ,polietilenoglicol 400 (PEG, Sigma-Aldrich), As amostras de sangue para os testes hemostáticos foram obtidas em colaboração com o Hospital Veterinário do Centro Universitário de Rio Preto-UNIRP. As amostras foram coletadas de um carneiro da raça Santa Inês (*Ovis aires*) por punção venosa, por meio da veia jugular, em bolsas de sangue com EDTA e estabilizado com citrato de sódio. O sangue foi armazenado a 8 °C antes do uso. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (Faculdade de Medicina- José do Rio Preto) no âmbito do protocolo número CAAE 48358215.9.0000.5415.

5.1 Sínteses dos materiais

As sínteses dos agentes hemostáticos a base de pectinas foram realizadas tomando por base a preparação de polímeros a base de pectinas relatadas por Rezvanain *et al*.(REZVANAIN et al., 2017), ao longo do trabalho de preparação dos materiais vários ajustes foram feitos, principalmente ajustes de concentrações de reagentes, controle de pH do gel polimérico, temperatura de sínteses, e condições de *cross-linking*. Um exemplo típico de preparação é descrito a seguir, e para melhor compreensão da sínteses dos materiais preparados nesse estudo, o processo de preparação será dividido em 3 partes, que são descritas a seguir:

Parte I: Inicialmente prepara-se uma solução (Solução A) adicionando-se 5,0g de pectina a 100 mL de água destilada sob agitação constante, e após dissolução da pectina adiciona-se a essa solução 2,5 g de polietilenoglicol (PEG). A solução-gel é mantida sob agitação constante (1000 rpm) por um período de 3 horas a 50°C, até que completa homogeneização seja atingida. Em seguida 10 ml de etanol (98%) é adicionado à solução sob agitação constante, e a reação prossegue por mais 1h/50°C, e um gel completamente homogêneo e de aspecto transparente é obtido.

Parte II: Do material preparado na parte I, pesa-se 20,0g do gel e esse gel é depositado lentamente numa placa de petri (10 cm x 15 cm), e em seguida a placa de petri é colocada numa estufa de convecção (48 horas/ 45°C) para a obtenção de um filme ou película

polimérica. Esse filme é denominado PEC-PEG (filme não “cross-linkado” à base de pectina e polietilenoglicol).

Parte III: A parte III do processo de preparação dos filmes é a reticulação (*cross-linking*) do filme de PEC-PEG, usando como agente de reticulação cloreto de cálcio ($CaCl_2$), e os graus de reticulação foram feitos usando soluções de cloreto de cálcio em diversas concentrações (massa/volume) de 0,5, 3 e 5 % . Um exemplo típico de reticulação pode ser descrito na seguinte forma: 0,5g de $CaCl_2$ foi dissolvido em 100 mL de água destilada, e após completa dissolução do $CaCl_2$, foi adicionado 7 mL de PEG (polietilenoglicol 400 (PEG), Aldrich) e a mistura foi agitada (600 rpm) por 15 minutos /25ºC. Essa solução foi denominada solução $CaCl_2$-PEG. Em seguida o filme PEC-PEG (obtido na parte II) foi imerso nessa solução de $CaCl_2$-PEG por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, sendo que entre os intervalos de cada submersão o filme foi previamente e cuidadosamente limpo por lenços umedecidos para remoção do excesso do gel. Após o período final de submersão (30 minutos) o filme foi seco overnight em temperatura ambiente. Esse filme reticulado foi denominado filme PEC-PEG-Ca-0.5. Os demais filmes foram preparados seguindo o mesmo protocolo, porém variando as concentrações das soluções de $CaCl_2$ e foram denominados PEC-PEG-Ca-0.5, PEC-PEG-Ca-3.0 e PEC-PEG-Ca-5.0 respectivamente.

6. RESULTADOS

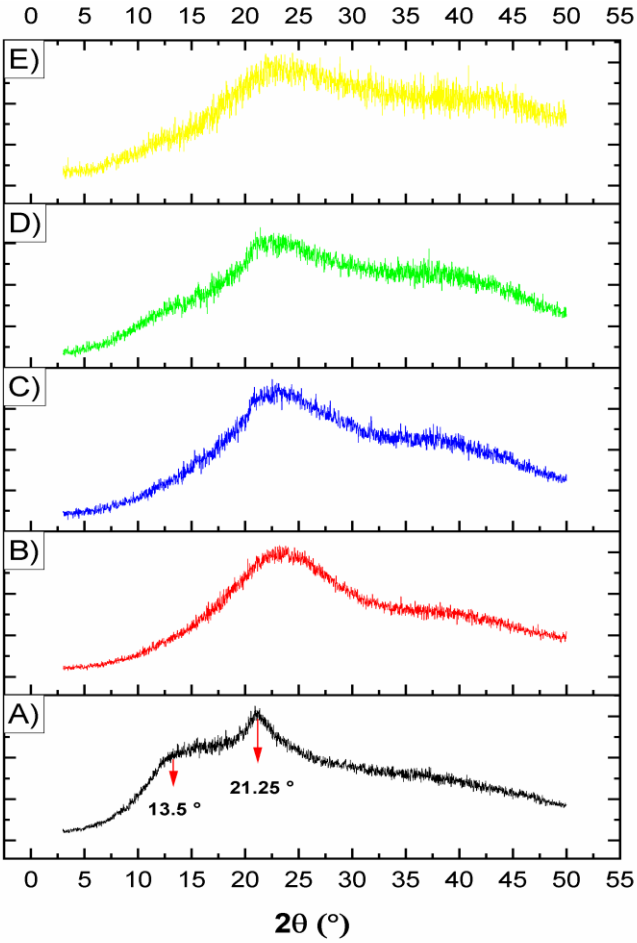
6.1 Difração de raios-x dos materiais poliméricos a base de pectina

A estrutura tridimensional de polímeros é definida pelo modo como as cadeias moleculares estão empacotadas, podendo ser desordenado, formando a fase amorfa, ou ordenado, regular e repetitivo, definindo a fase cristalina. Assim, a cristalinidade em polímeros consiste no alinhamento de segmentos de cadeias em arranjo tridimensional. Este arranjo ordenado das cadeias poliméricos da fase cristalina depende da natureza do polímeros e pode ser estudado por difração de raios-x (DRX). Os domínios cristalinos, chamados cristalitos , são muito menores que os cristais normais e estão interconectados com as regiões amorfas. Em contraste com materiais cristalinos, os quais apresentam um

padrão de difração bem definido , materiais poliméricos apresentam reflexões de Bragg largas e sobrepostas a um padrão difuso.

Analises de difração de raios-x foram realizadas para fornecer informações estruturais dos materiais preparados à base pectina, e a influência da reticulação com cátions de Ca^{2+} na estrutura molecular dos biopolímeros. Os dados de raios-x apresentam um padrão de difração caracterizado por regiões amorfas e de baixa cristalinidade. De acordo com os dados reportados na literatura, o biopolimero pectina é caracterizado por dois picos de difração na região de 2Θ= 13,5º e 21,25º. Jiang et al (JIANG et al., 2020), em um estudo mais atualizado sobre a propriedade estruturais da pectina atribuem baixa cristalinidade a complexa distribuição do peso molecular do biopolímeros pectina, portanto os dados experimentais obtidos nessa etapa do trabalho corroboram os dados reportados na literatura . Na fig.13a, (amostra pura de pectina, PEC) os picos de difração em 2Θ= 13,5º e 21,25º foram observados e devidamente assinalados , e nos demais derivados reticulados (fig.13b-e) foi observado o desparecimento original dessas duas reflexões em 2Θ= 13,5º e 21,25º). Este padrão de difração de raios-x caracterizado por essa baixa cristalinidade (2Θ= 13,5º e 21,25º) foi também observado e reportado por outros pesquisadores. Kumar et al(KUMAR; CHAUHAN, 2010) em seus estudos sobre inibição de lipase pancreática (steapsin) usando polímeros derivados de pectina reportaram dados de difração de raios-x similares ao dados experimentais obtidos nesse estudo. Mishra et al (MISHRA et al., 2008)em seu estudo de preparação de hidrogeis a base de pectina com alto peso molecular (pm= MW ~30,000–100,000) e polivinilpirrolidina para o proposito de drug-delivery observaram picos de difração nas regiões de (2Θ= 9º , 12.70º , 18.42º , 28.22º , e 40.14º). De uma maneira geral o efeito da reticulação da rede polimérica com os cátions de Ca^{2+} não pode ser observado diretamente através da análise dos difratogramas de raios-x, devido ao fato que a própria difração de raios-x apresentar limitações na caracterização físico-químico desses materiais poliméricos. Todavia, independente do grau de cristalinidade dos materiais derivados de pectina (figura 1), para efetivamente se comprovar o efeito da reticulação dos polímeros à base de pectina devido ação do cátion Ca^{2+} (formação das estruturas egg-shell) na rede polimérica, a obtenção de dados experimentais usando técnicas espectroscópicas complementares (FT-IR, ^{13}C-NMR-MAS,) foi empregado nas análises das amostras preparadas nesse , e são discutidos na próxima seção.

Figura 11. DRX dos materiais à base de pectina. A) Pectina 74% (Pec 74%), B) PEC-PEG, C) PEC-PEG-Ca-0.5, D) PEC-PEG-Ca-3, E) PEC-PEG-Ca-5



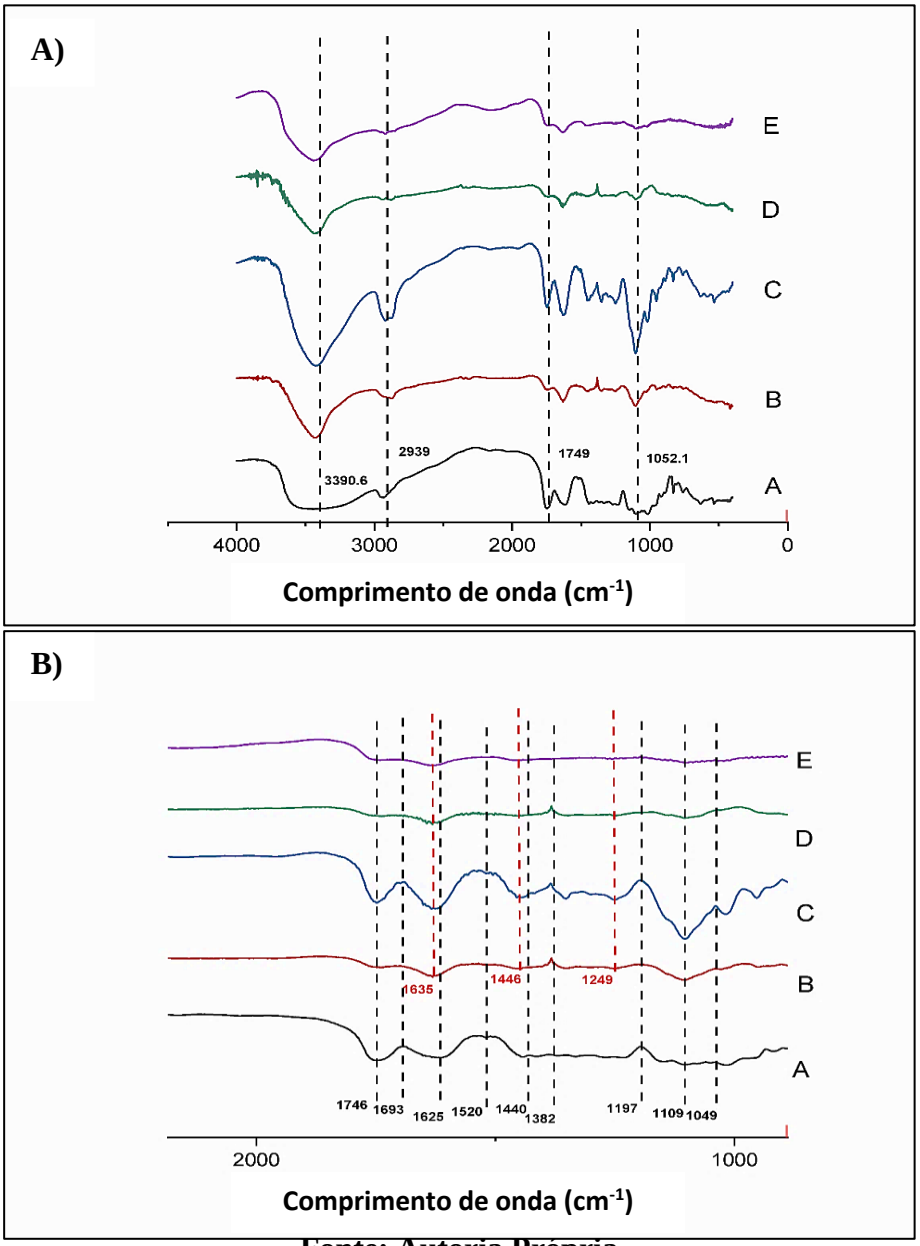
Fonte: Autoria Própria

6.2 Espectroscopia no infravermelho-FTIR

Os dados experimentais de FT-IR são apresentados na figura 14. As bandas espectrais dos materiais preparados foram observadas nas seguintes regiões espectrais**:** a) 3390.6 cm^{-1} e estão relacionadas a vibração dos grupos O-H , b) uma banda de absorção na região de 2939 cm^{-1} que está relacionada ao estiramento assimétrico C-H dos grupos carboxílicos metilados (CH_2, CH_3) da estrutura molecular da pectina, c) duas bandas na região de 749 cm^{-1} e 1052 cm^{-} relacionadas ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo C=O relacionados a unidade básica do ácido galacturônico. Os dados experimentais obtidos estão de acordo com as bandas de absorção reportadas na literatura por Selija et al.(ŠEŠLIJA et al., 2018) , e Noh et al (NOH et al., 2018).

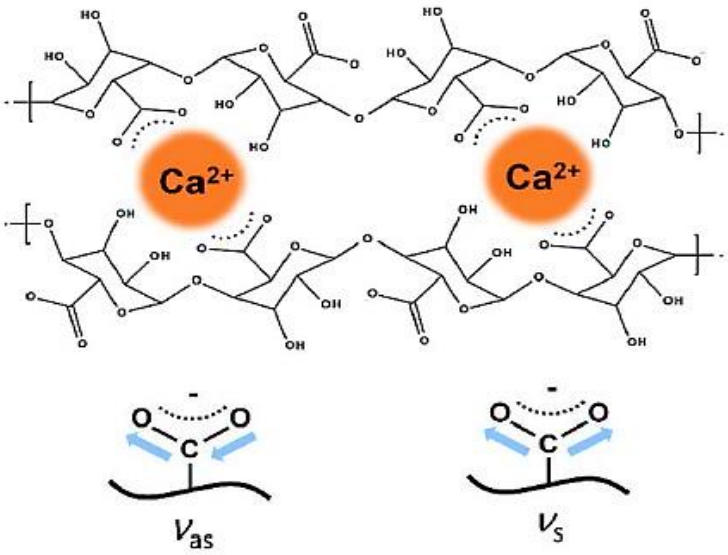
A progressão do processo de reticulação causada pela adição dos cátion Ca^{2+} foi caracterizada pela interação ligação química entre os cátions Ca^{2+} com os grupos C-OH e C=O da pectina, essa interação induz um decréscimo na intensidade das bandas espectrais nas bandas de absorção 1756 cm^{-1} e 1625 cm^{-1} (fig.14b). Baseado nos dados de FT-IR um possível mecanismo para a interação entre os cátions Ca^{2+} e os grupos C-OH e C=O é apresentado na fig.14.

Figura 12. Espectroscopia de infravermelho para as amostras A) Pectina 74%; B) PEC-PEG; C. PEC-PEG-Ca-0.5; D) PEC-PEG-Ca-3; E) PEC-PEG-Ca-5; A) Espectro no range de 0 a 4000 cm^{-1}; B) Inset da região entre 800 e 2000 cm^{-1}



Fonte: Autoria Própria

Figura 13. Exemplo de conformação da estrutura tipo "egg-box" e seus modos de vibração.



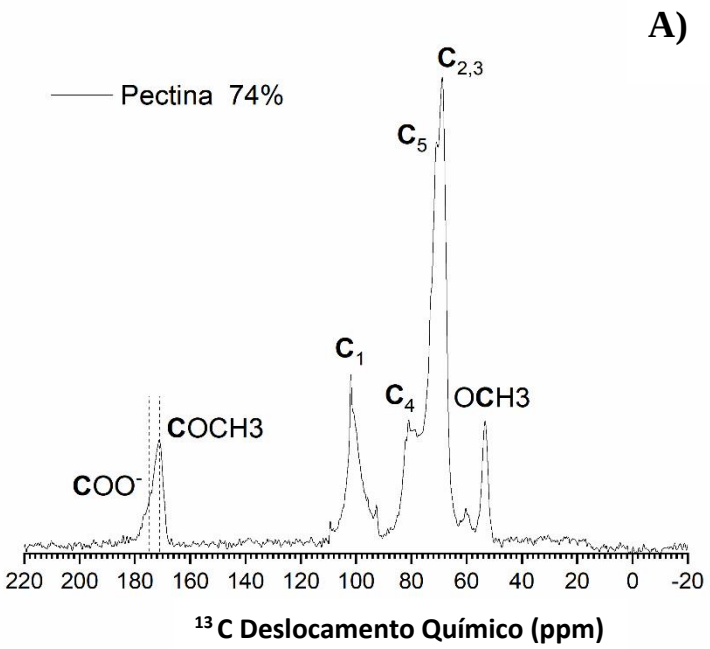
Fonte: J Noh.(NOH et al., 2018)

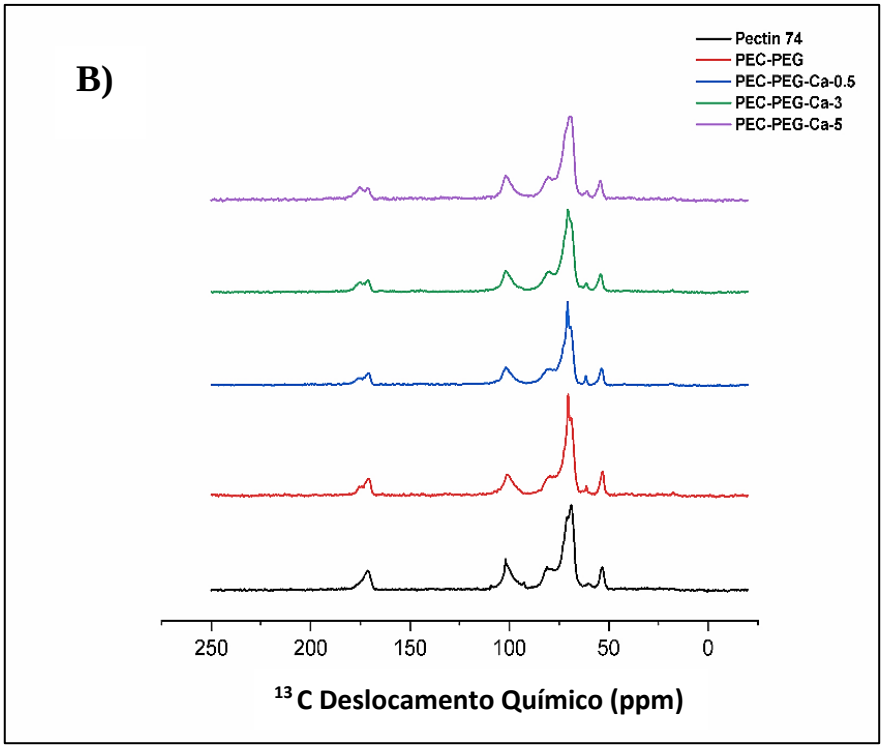
6.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

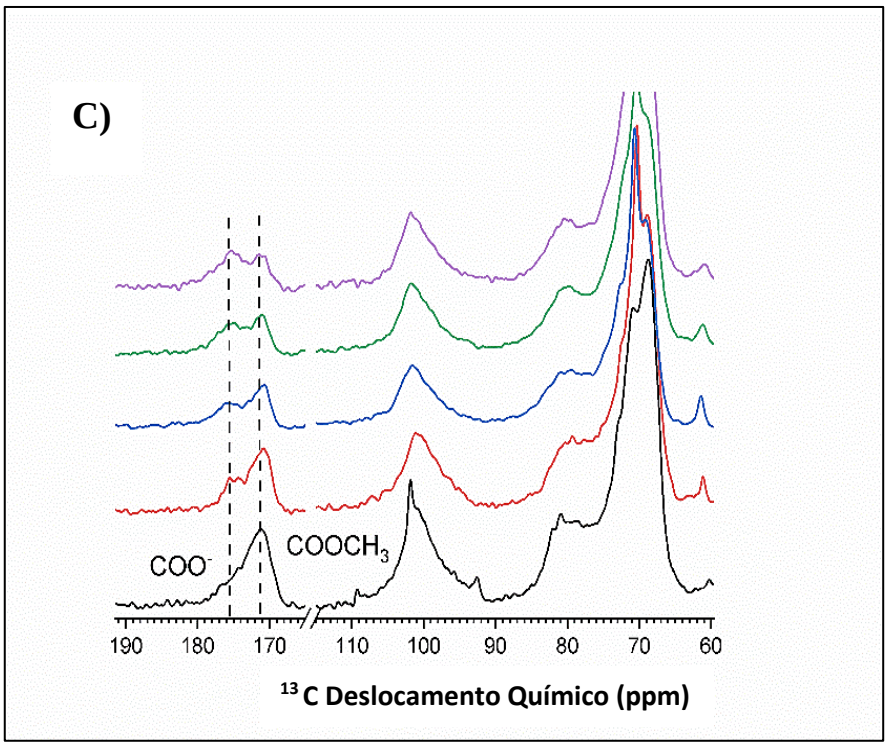
Os deslocamentos químicos (chemical shifts) reportados na literatura para a pectina são apresentados na figura 4. A fig.4a apresenta os deslocamentos químicos característico da pectina. De acordo com a literatura esses deslocamentos químicos são: a) o deslocamento químico relacionado ao grupo o-acetil, grupo esse ligado ao C3 através de uma ligação simples de oxigênio, está localizado na região de 53 ppm, b) O deslocamento químico dos grupos carboxílicos (correspondente ao carbono C6) está localizado na região de 171 ppm (JARVIS; APPERLEY, 1995). Os deslocamentos químicos observados na região de 101 ppm e 80 ppm correspondem aos C1 e C4 ligados ao grupo glicosídico da pectina . Os deslocamento químicos na região de 68 e 70 ppm correspondem respectivamente aos carbonos (C2, C3) e (C5) do anel pirenoide da pectina (RENARD; JARVIS, 1999). A fig.16b apresenta os resultados experimentais obtidos nesse estudo, e os deslocamentos químicos observados estão de acordo com os resultados reportados na literatura e mostrados na fig.16a. Todavia, uma análise cuidadosa dos dados apresentados na fig.4b, indicam que com o aumento da concentração dos cátions de Ca^{2+}, observa-se o surgimento do grupo COO^{-} na região 177 ppm evidenciando a

interação dos cátions Ca^{2+} com esse grupo químico, conforme proposto no esquema de formação das estruturas de “ egg-shell” (figura 16). Os dados indicam que antes da reticulação da rede polimérica com os cátions Ca^{2+} esse deslocamento químico não estava incialmente presente, portanto os dados indicam que as estruturas “ egg-shell” foram formadas (OCHOA-VILLARREAL; AISPURO-HERNÁNDEZ, 2012), (JARVIS; APPERLEY, 1995; SYNYTSYA; OPÍKOVÁ; BRUS, 2018). A fig.16c apresenta um inset dos espectros de NMR para uma melhor visualização da evidencia da formação “egg-shell” evidenciada pelo deslocamento químico na região de 177 ppm.

Figura 14. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear: A) Pectina 74% e os filmes PEC-PEG, PEC-PEG-0,5%, PEC-PEG-3% e PEC-PEG-5%; B) Tecnica 13C SPEMAS para a mobilidade do PEG na formação dos filmes







Fonte: Autoria Própria

6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

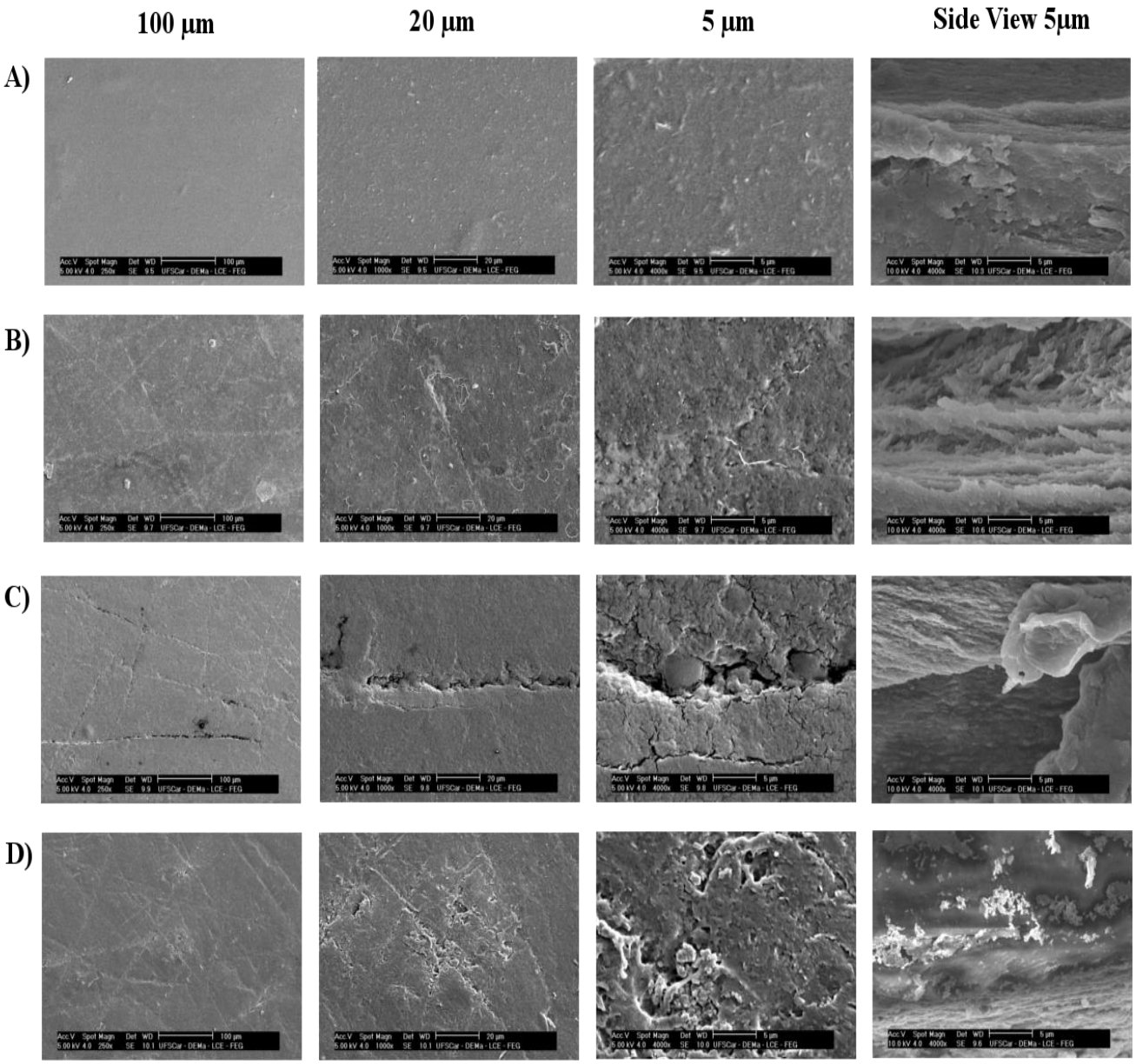
O filme não reticulado de PEC-PEG (Fig. 17 A) apresenta uma matriz densa com uma pequena rugosidade causada pelo processo de interação física entre o PEG e a Pectina(REZVANAIN et al., 2017; ŠEŠLIJA et al., 2018). Essa variação pode ser resultante da reorientação de grupos funcionais polares em direção ao topo superfície de filme binário (pectina e PEG) observando-se alguma imiscibilidade entre os componentes do filme (ŠEŠLIJA et al., 2018)**.** Os filmes que são submetidos ao processo de reticulação apresentam linhas quase ordenadas, sendo mais evidentes à medida que se incrementa a quantidade de cálcio na reação (Fig. 17 B), C), D)). Isso ocorre quando matriz é composta apenas pelo biopolímeros (pectina).

As interações físicas entre os carbono C4 e C6 da pectina com os íons de cálcio no interior das múltiplas cadeias leva a formações de estruturas tipo *egg-box* (BRACCINI; PÉREZ, 2001). Estas estruturas podem apresentar grandes formações de reticulações om uma fase separada da outra, dentre as múltiplas camadas matriz (FARRIS et al., 2011; REZVANAIN et al., 2017; SRIAMORNSAK, 2003) (Fig. 17 B) C) E D) Side view) do PEG , o que acarreta numa maior reticulação e, portanto, filmes mais homogêneos. O cálcio presente ajuda significativamente na porosidade do material hemostático através da formação dos *scaffolds* (SRIAMORNSAK, 2003). A ação dos scaffolds favorece a porosidade e absorção do material(ALTINTOP et al., 2020), o qual vai ser analisado na seção 7.6 e 7.7.

Na Fig. 18, que apresenta o EDS (Espectroscopia de raios X por dispersão em energia) dos filmes reticulados, e verifica-se que as linhas são formações de cadeias poliméricas de formas tipo "*egg-box*", primeiro porque os filmes que não são reticulados não apresentam esta morfologia (Fig. 17 A), e segundo pois a distribuição dos elementos mostra que as linhas que apresentam erosão são ocupadas predominantemente pelos íons de cálcio, além de estarem uniformemente distribuídos sobre toda a matriz. A distribuição do carbono e oxigênio, especialmente sobre as rachaduras, permite inferir que as estruturas predominantes nessas regiões são de tipo *egg-box* e que a distribuição uniforme do cálcio sobre a superfície dos filmes é causado pelo o efeito da reticulação (ASSIFAOUI et al., 2015). As fissuras observadas nos filmes reticulados causadas pelo

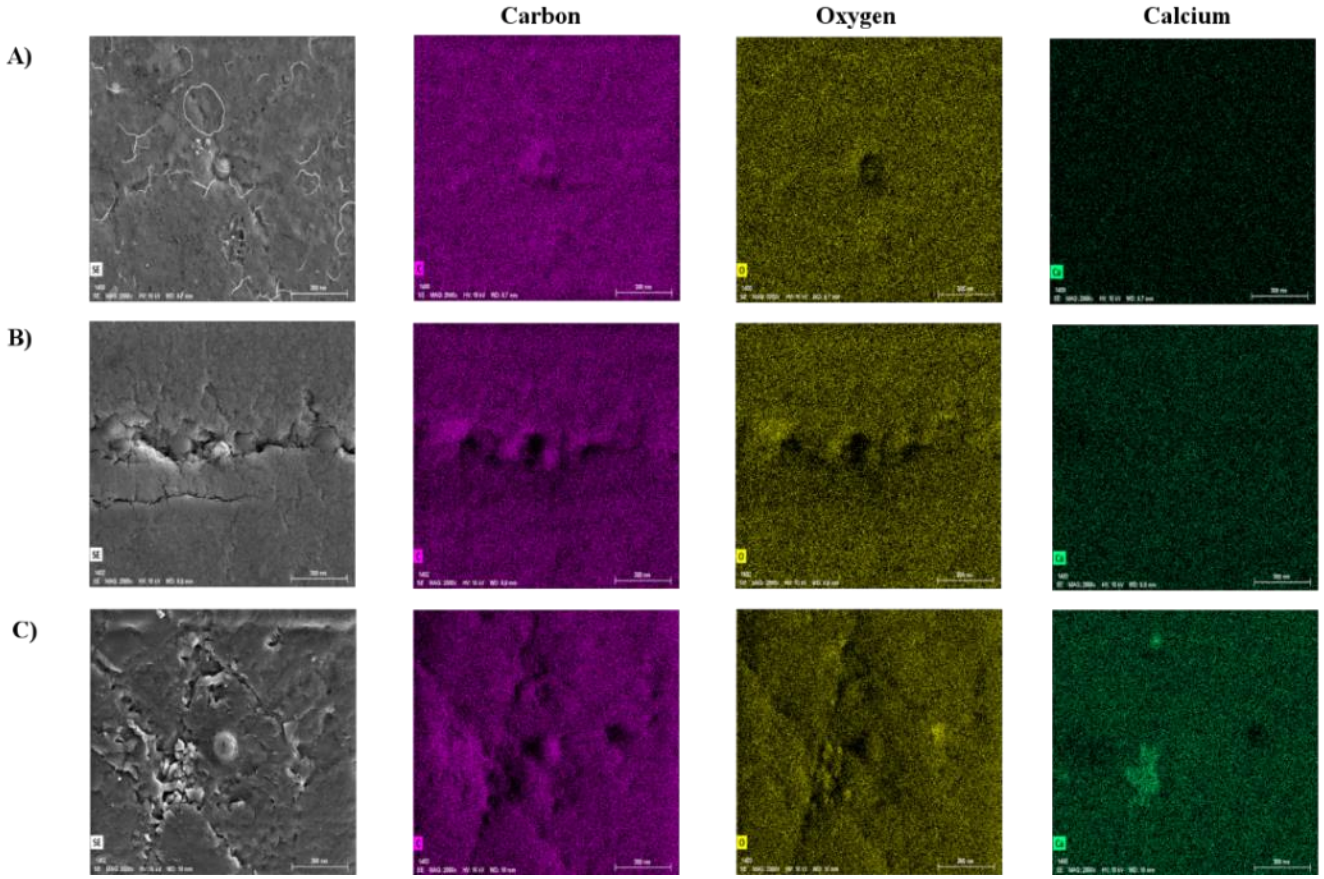
ordenamento das estruturas ionizadas**,** permitiram a interação do material não só no contato superficial, também da matriz interna dos filmes.

Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura dos filmes: A) PEC-PEG, B) PEC-PEG-0.5, C) PEC-PEG-3, D) PEC-PEG-5 com magnitudes de 250, 1000 e 4000x respetivamente. O "Side View" tem uma magnitude de 4000x.



Fonte: Autoria Própria

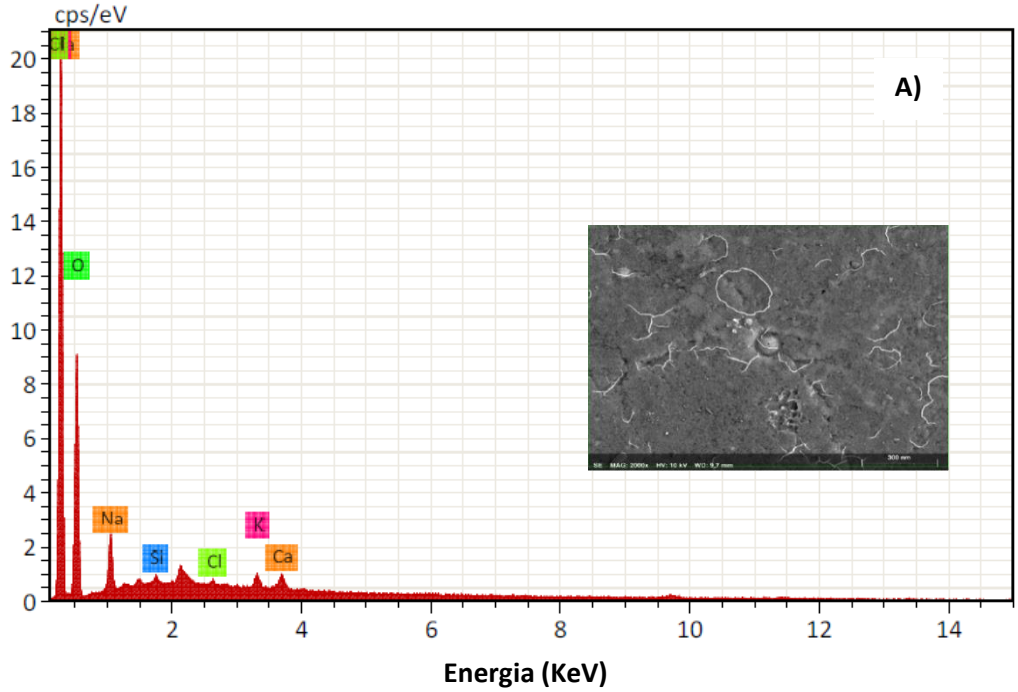
Figura 16.EDS dos filmes reticulados. A) PEC-PEG-Ca-0.5 B) PEC-PEG-Ca-3 C) PEC-PEG-Ca-5

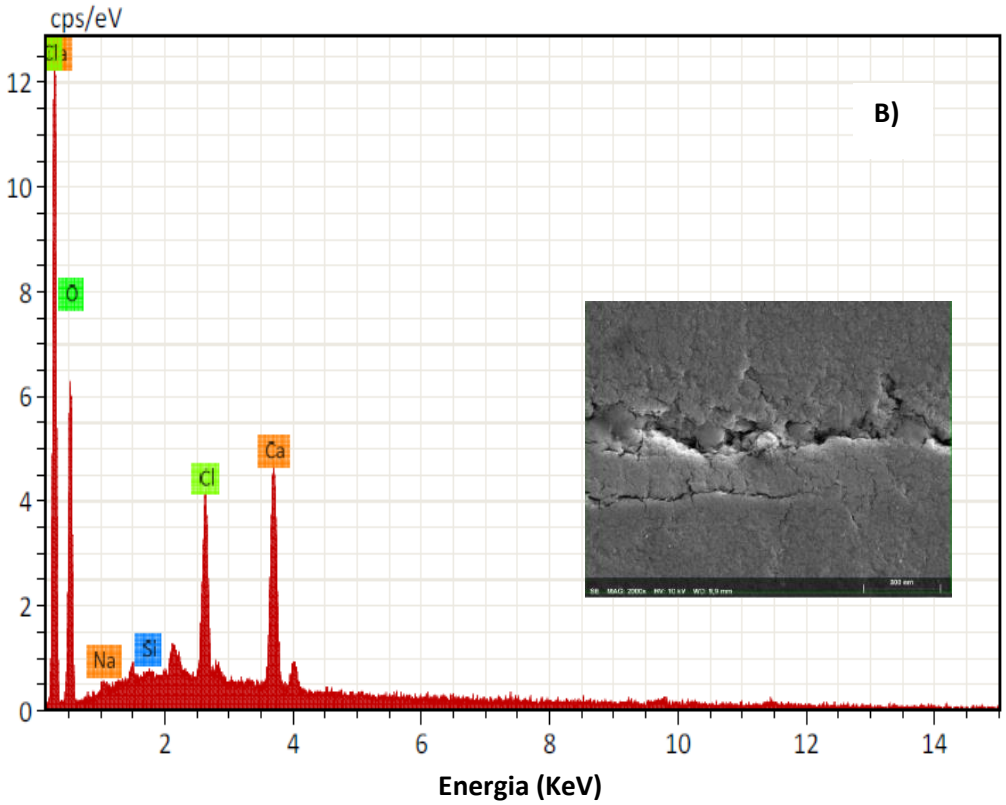


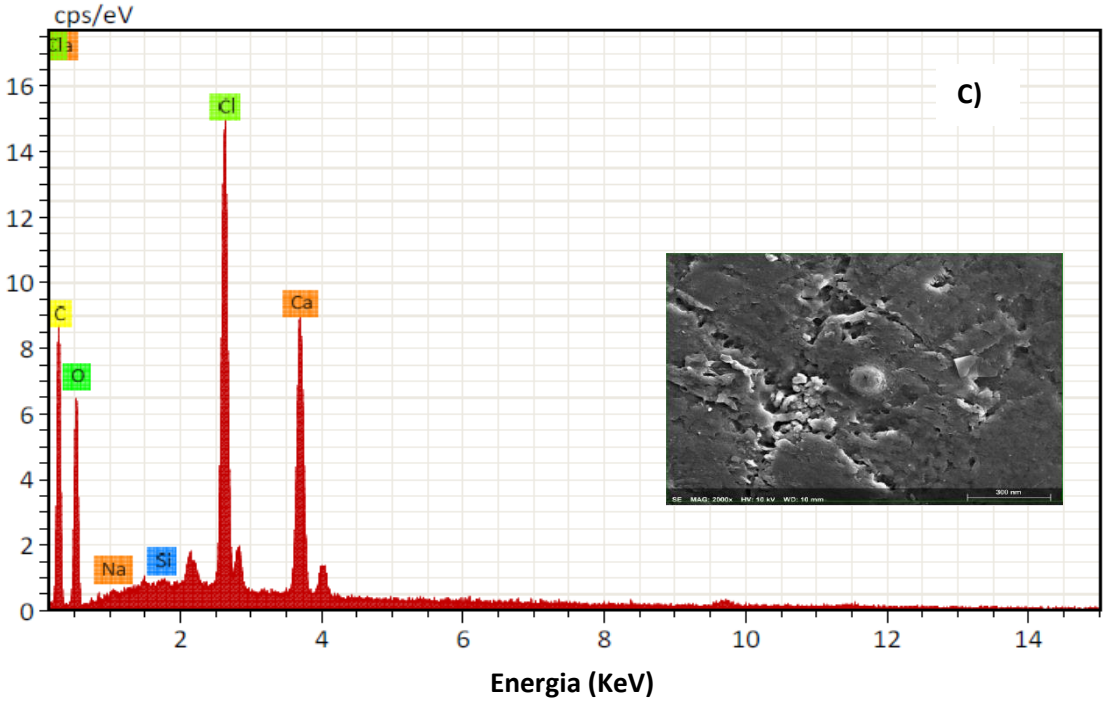
Fonte: Autoria Própria

A figura 19 mostra os espetros de emissão obtidos pela técnica EDS, mostrando principalmente a presencia do cálcio nas redes reticuladas. Esta quantidade aumenta proporcionalmente à medida que o cálcio presentes nas sínteses, retificando que o cálcio está presente nos filmes sintetizados.

Figura 17. Espetros de emissão do EDS das amostras A) PEC-PEG-Ca-0.5, B) PEC-PEG-Ca-3, C) PEC-PEG-Ca-5







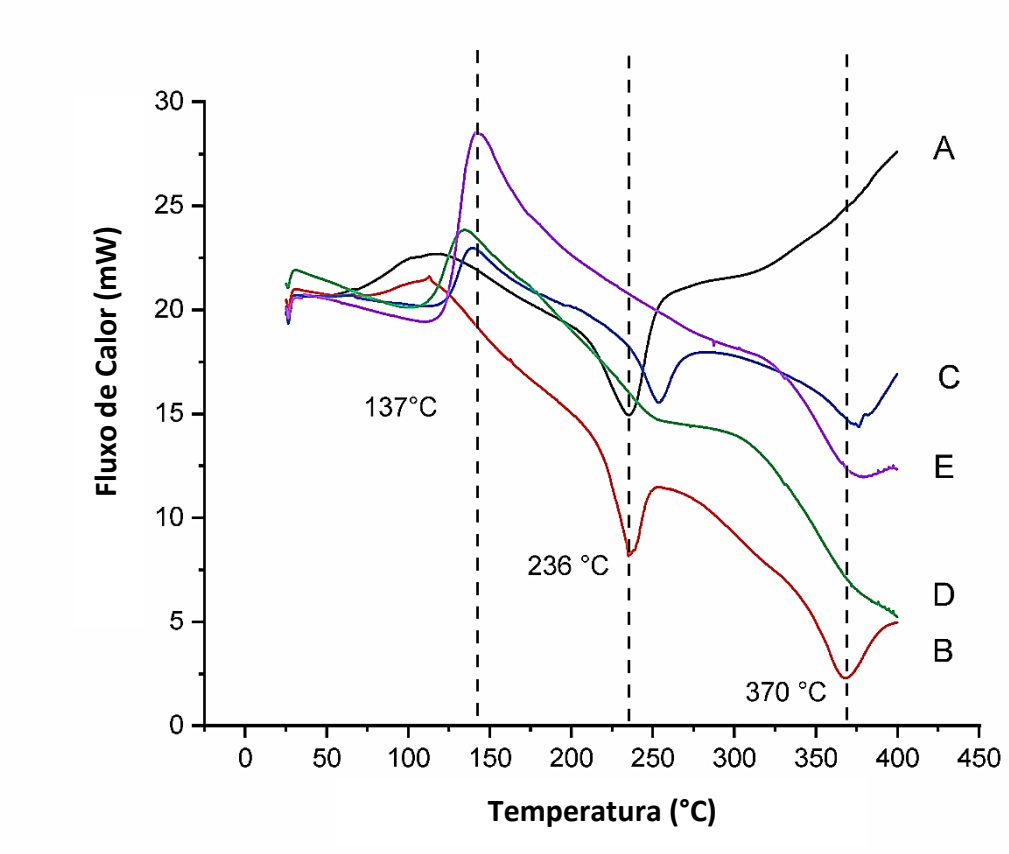
Fonte: Autoria Própria

6.5 Análise térmica dos materiais poliméricos sintetizados

A análise de DSC dos filmes não reticulados (Fig. 20. B) mostram três etapas consideráveis no processo térmico entre 127°C e 370°C. A etapa primeira, comum a todas as amostras apresenta um pico exotérmico por volta de 127 °C , que está associado a presença de moléculas de água na estrutura polimérica a qual corresponde a uma entalpia aproximada de 128,2 J/g (FARRIS et al., 2011; REZVANAIN et al., 2017). A segunda etapa, também comum em todos os materiais indica um pico endotérmico na região de 236ºC que corresponde a degradação da pectina (FARRIS et al., 2011; REZVANAIN et al., 2017; ŠEŠLIJA et al., 2018). Todavia, pode-se observar o efeito da reticulação com cátions Ca^{2+} no comportamento térmico desses materiais. Enquanto para as amostras de pectina pura e no polímero pectina-polietilenoglicol (Fig. 20 B) a decomposição ocorre na temperatura de 236ºC, nas amostras contendo Ca^{2+}, esse pico de degradação ocorre em temperaturas maiores: para a amostra PEC-PEG-Ca-0.5 (Fig. 20 C) esse pico desloca-se para 257ºC, e para as amostras PEC-PEG-Ca-3 e PEC-PEG-Ca-

5 (Fig. 20 D, E) a perda de moléculas de água ocorrem a 136ºC (360.5861 J/g), e as amostras são estáveis até a temperatura de 370ºC. Os dados claramente evidenciam a ação da reticulação induzida pelos cátions Ca^{2+}, corroborando a formação das estruturas "*egg*

Figura 18. DSC das amostras A) Pectina 74%, B) PEC-PEG, C) PEC-PEG-0.5, D) PEC-PEG-3, E) PEC-PEG-5.



box, já evidenciadas pelas análises de DRX, FT-IR, e ^{13}C-NMR-MAS.

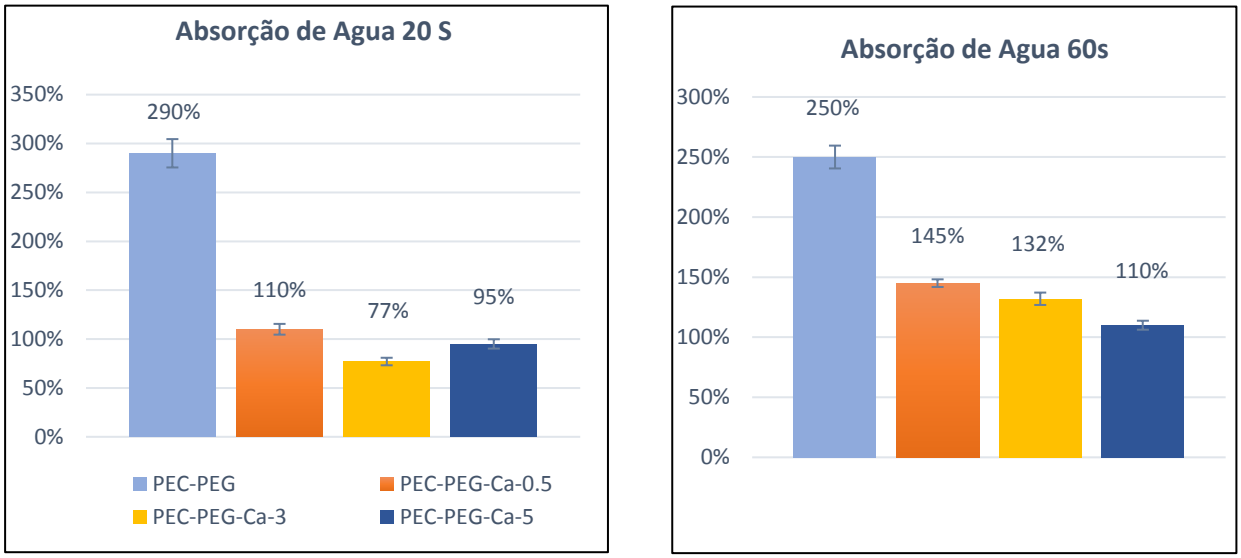
Fonte: Autoria Própria

6.6 Avaliação da absorção físico-química de água e sangue.

Estudos para verificação do comportamento dos filmes hemostáticos em relação a sua capacidade de absorção foram feitos com água e sangue de carneiro Santa Inês (*Ovis aires*). Os resultados experimentais são apresentados nas figuras 21 e 22 respetivamente. Os dados referentes a absorção de água indicam que o filme PEC-PEG absorve uma quantidade de moléculas de água muito maior do que os filmes hemostáticos (PEC-PEG-0.5, PEC-PEG-3.0, e PEC-PEG-5.0). Uma possível explicação para esse comportamento

foi dada por Pasini *et al*.(PASINI CABELLO et al., 2015) que atribuíram tal comportamento a natureza higroscópica do polietilenoglicol (PEG), polímero que pertence a família dos óxidos poli alquenos, e sua ligação com a cadeia da pectina (PEC) que induz o rompimento da cadeia polimérica da pectina, resultando num sistema que favorece uma maior absorção de moléculas de água (PASINI CABELLO et al., 2015).

Figura 19. Porcentagem de absorção da Água na superfície dos filmes: A) Tempo de 20 segundos; B) Tempo de 60 segundos

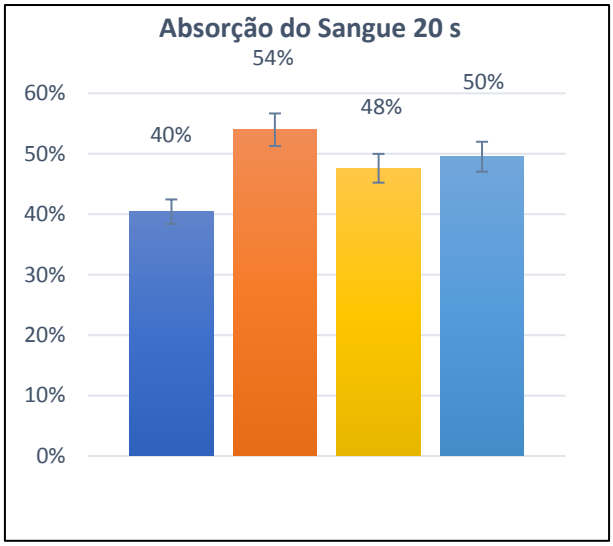


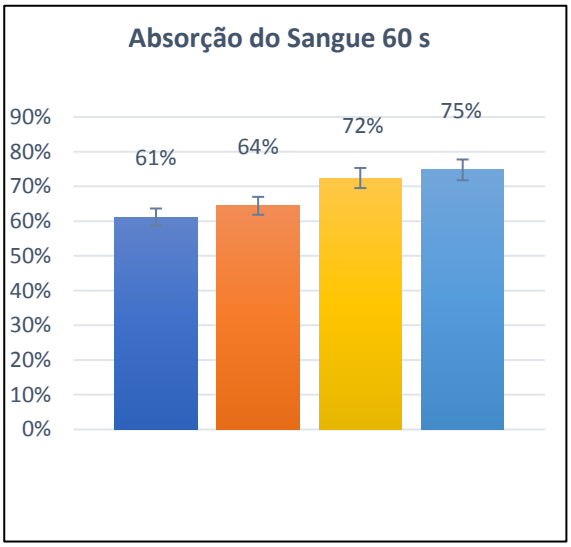
Fonte: Autoria Própria

Os filmes reticulados com cátions Ca^{2+} tem uma absorção de moléculas muito menor em comparação com o filme PEC-PEG. Há duas possíveis explicações para tal comportamento, sendo que a primeira está relacionada à plastificação do material hemostático devido ao processo da reticulação, conforme descrita no procedimento de sínteses dos materiais, o que faz que os materiais fiquem mais compactados reduzindo drasticamente a sua capacidade de absorção de água (PASINI CABELLO et al., 2015). A segunda explicação pode ser atribuída pela própria formação das estruturas de *egg-shell* entre as cadeias desmetoxilizadas de pectina com os íons de cálcio, conforme proposto por Braccini *et al* (BRACCINI; PÉREZ, 2001). Nesse modelo as formações das estruturas de *egg-shell* são basicamente atribuídas as fortes interações eletrostáticas com o cátion Ca^{2+} que inicialmente induz deslocamentos paralelos e antiparalelos na cadeia polimérica da pectina. A presença dos cátions Ca^{2+} disponibilizam mais elétrons para que

ocorram as ligações de van der Waals entre o cátion Ca^{2+} e os sítios de ligação COO-, e ocorrendo essas interações, há uma redução do tamanho da cavidade maior originalmente presente na pectina, e o surgimento de duas sub-cavidades que possuem o tamanho das ligações entre o Ca^{2+}- COO^{-}. O resultado final é uma rede intermolecular formada por ligações de hidrogênio (BRACCINI; PÉREZ, 2001). Logo essa diminuição do tamanho da cavidade original em sub-cavidades menores é responsável pela baixa absorção de água dos polímeros reticulados em comparação com o material PEC-PEG, como o qual a medida que aumenta a reticulação dos filmes a hidrofilicidade diminui (TRIPATHI; MEHROTRA; DUTTA, 2010)

Figura 20. Absorção do Sangue superficial para os filmes: A) 20 segundos de interação; B) 60 segundos de interação





Fonte: Autoria Própria

No caso da absorção para o sangue de carneiro Santa Inês (*Ovis aires*) é evidente a mudança na absorção do material hemostático como demonstrado na figura 22. Nesse caso, os materiais reticulados apresentaram uma maior absorção de sangue (fig.22)..

Durante os estudos de absorção de água e sangue com os filmes hemostáticos, foi observado um fenômeno bastante interessante denominado "*Swelling effect*". Lendlein *et al* (LENDLEIN; KELCH, 2002) revisaram na literatura os materiais poliméricos que apresentam esse fenômeno. No caso específico dos géis de polímero, uma propriedade notável desses materiais é sua capacidade de reagir às mudanças nas condições externas resultando em consideráveis alterações de volume, inchaço ou encolhimento do material.

O estímulo externo não se limita apenas às mudanças de temperatura, mas também mudanças de volume também pode ser desencadeada por uma variação no valor do pH, força iônica, ou a qualidade (constante dielétrica) do solvente (LENDLEIN; KELCH, 2002).

Este fenômeno de inchamento (swelling behavior) foi observado para todos os materiais reportado nesse estudo e foi estudado em detalhes para a amostra PEC-PEG-5, conforme demonstrado nas figuras 23 e 24. De acordo com os dados, após 40 segundos em contato com o sangue o filme hemostático começa a dobrar-se simetricamente e após 70 segundos o dobramento está completo, e instantes depois após atingir esse dobramento máximo o filme inicia o seu processo de retorno a morfologia original (morfologia plana). Nesse caso, "swelling behaviour" é causado pela interação interfacial e troca de calor entre as hemácias de sangue e o filme polimérico hemostático (PEG-PEC-5) após o contato entre eles, o que direciona o sistema ao equilíbrio térmico (37°C), que é a temperatura do sangue no corpo humano.

Neste caso, a estabilidade morfológica dos filmes reticulados com cátions Ca^{2+}, faz com que esses filmes voltem a forma original após um certo tempo, pois o aumento da viscosidade ao longo da linha simétrica dos filmes aumenta o fator de absorção e, portanto, a ação hemostática do material.

Figura 21.Sequência de tempo de absorção do filme PEC-PEG-Ca-5, em intervalos de 10 segundos

Fonte: Autoria Própria

Figura 22.Sequência de tempo de absorção do filme PEC-PEG-Ca-5 em intervalos de 10, 70 e 120 segundos.

Fonte: Autoria Própria

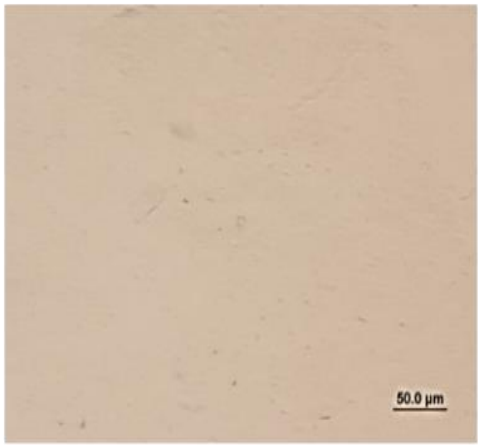
6.7 Avaliação da ação hemostática dos filmes usando microscopia de contrate.

Após os estudos de absorção de água e sangue de carneiro Santa Inês (*Ovis aires*), um estudo mais detalhado de microscopia de contrate foi feito para entendermos melhor a interação das moléculas de sangue com os filmes poliméricos hemostáticos. A microscopia de contraste de fase mostra a ação da absorção de sangue dos filmes reticulados, pois a medida que aumenta a quantidade das concentrações de Ca^{2+}, aumenta-se a eficiência do material como agente hemostático, pois favorece os processos da cascata de coagulação (SMITH, 2009; TRIPATHI; MEHROTRA; DUTTA, 2010). Os materiais com maior reticulação mostram uma forte adsorção, que permitem que o fluxo sanguíneo seja absorvido mais fácil e rapidamente pelos filmes reticulados, permitindo-se assim também a interação de cadeias internas de reticulação, ajudando assim mais rapidamente no processo de coagulação, pois as hemácias são levadas para o interior da membrana ou filme hemostático quando ocorre o contato e a absorção físico-química. A Figura 25. mostra em detalhes (teste controle) a superfície do filme hemostático PEC-PEG-5 e as hemácias das moléculas de sangue. e a Figura 26 o efeito da interação das hemácias e a superfície do filme hemostático desde o contato inicial (t=0) até a coagulação total (t=4min). As imagens claramente mostram o efeito da coagulação nos pontos escuros, enquanto as hemácias não coaguladas continuam como pontos brilhantes nas imagens. Este comportamento foi observado para todos os filmes hemostáticos (fig.

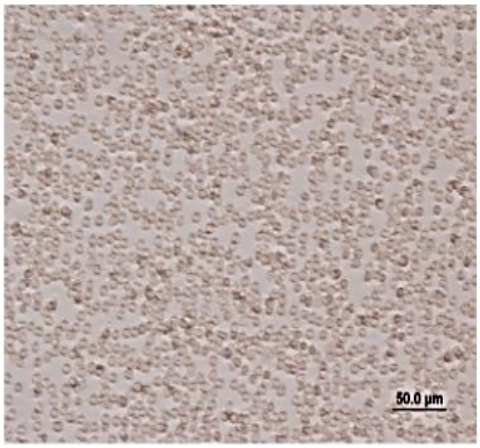
29), onde novamente os filmes com maior grau de reticulação apontam em direção a uma melhor ação hemostática. Imagens coletadas, a cada 10 s, para a amostra PEC-PEG-3 a partir do que ocorre no intervalo de 2-4 min entre as hemácias e a superfície do filme hemostático. Pode-se se observar que a ação dos filmes hemostáticos tem duas fases bastantes distintas e interligadas: a redução do movimento browniano das hemácias sanguíneas e a imediata ação hemostática e migração das hemácias para o interior do filme hemostáticos (*scafolds*. Fig.27). Sumariamente, os dados indicam que os filmes reticulados mostram uma eficácia como agentes hemostáticos, através da retenção do fluxo de sangue (movimento browniano) e imediato ativação da cascata de coagulação (Fig. 28.) (HEWITT et al., 2001; KHEIRABADI et al., 2005; KONERTZ et al., 2003; NEUFFER et al., 2004).

Figura 23. A) Superfície do material reticulado (PEC-PEG-Ca-5) B) Sangue de Carneiro Santa Inês (Ovis aires) (Controle)

A

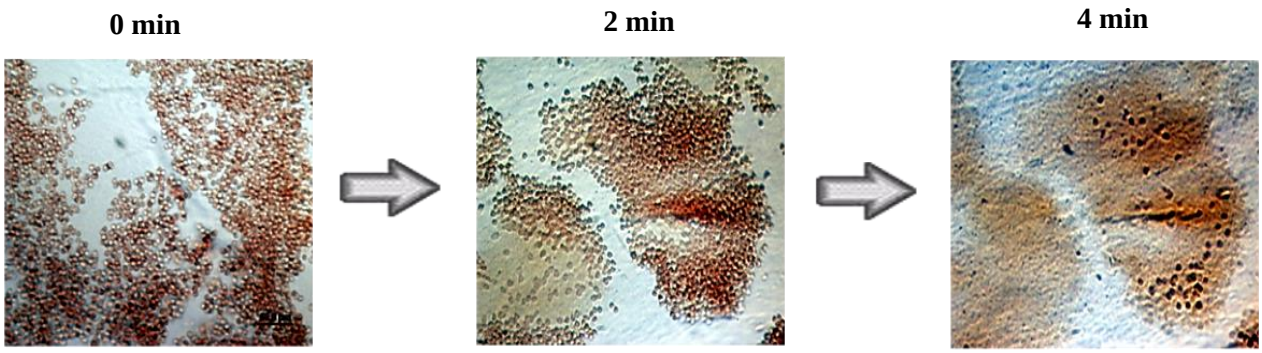


B



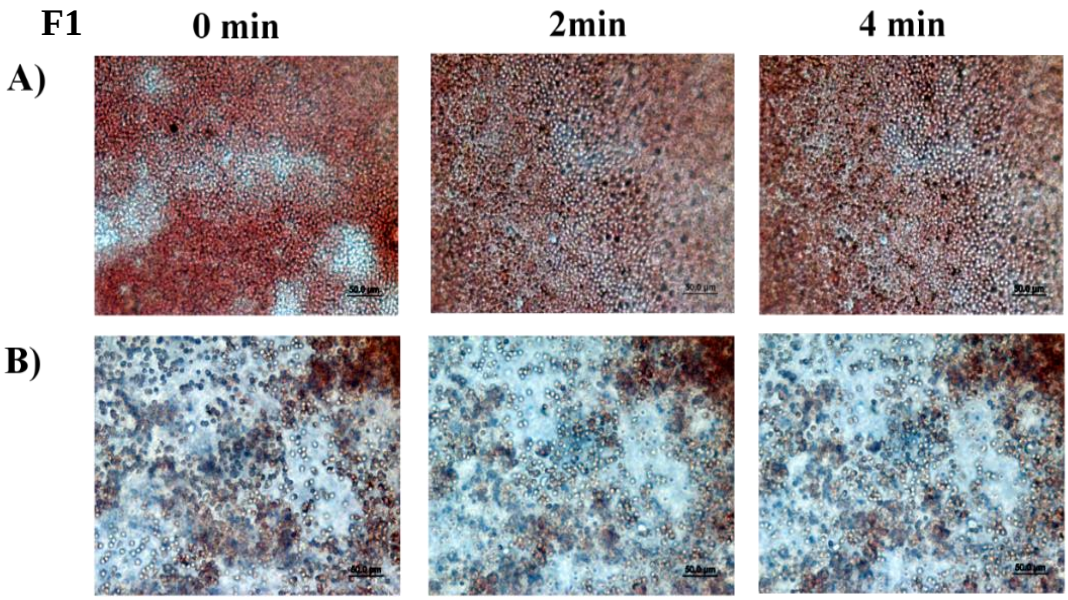
Fonte: Autoria Própria

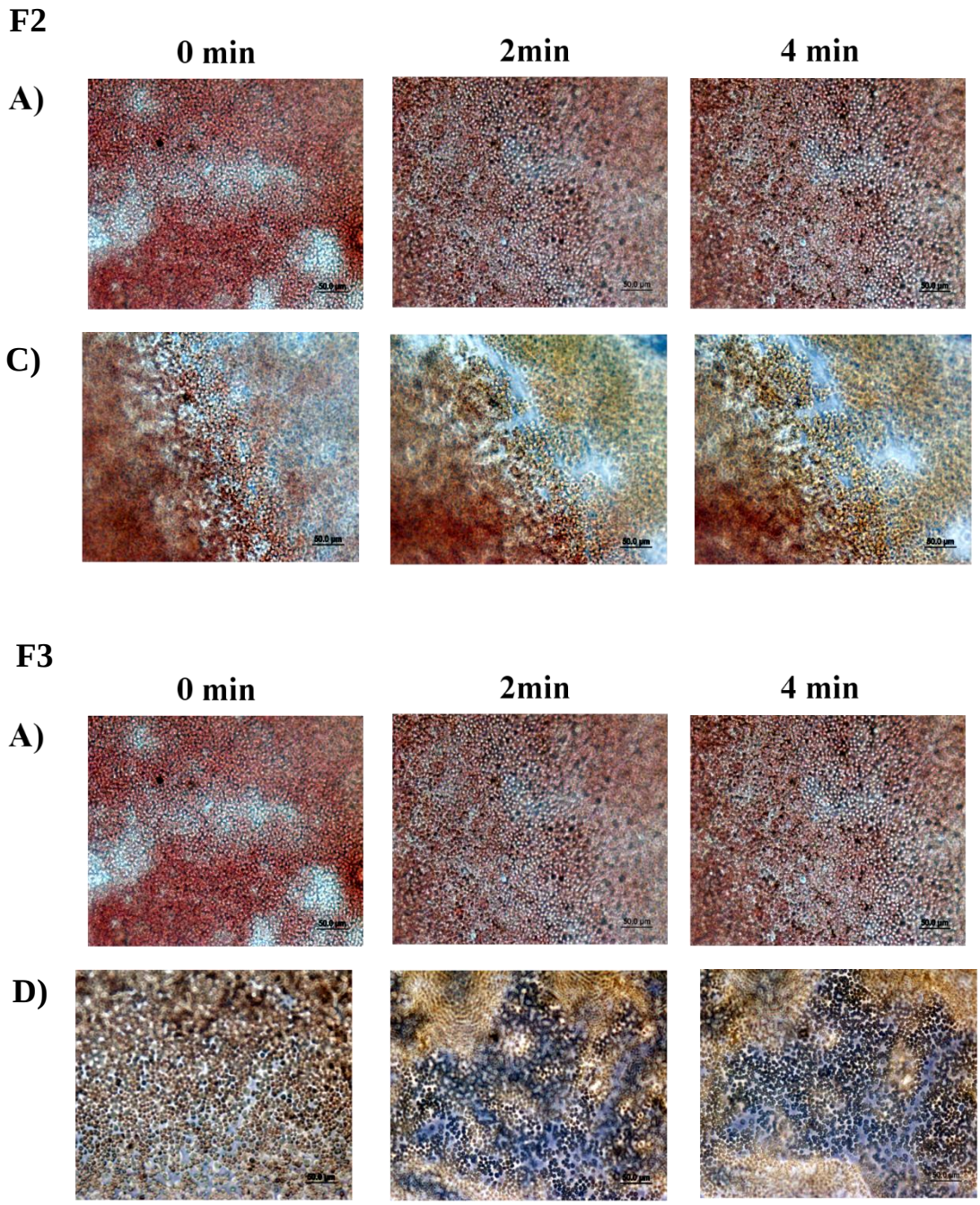
Figura 24. Sequência de absorção dos filmes reticulados: Exemplo de PEC-PEG-Ca-5, em tempos de 0 min (primeiro contato com a superfície), e 2 e 4 minutos respetivamente



Fonte: Autoria Própria

Figura 25. Absorção do sangue dos filmes em tempos 0min, 2 min e 4 min: A) PEC-PEG; reticulados :B) PEC-PEG-Ca-0.5 D) PEC-PEG-Ca-3, E) PEC-PEG-Ca-5, em magnitude de 50 µm



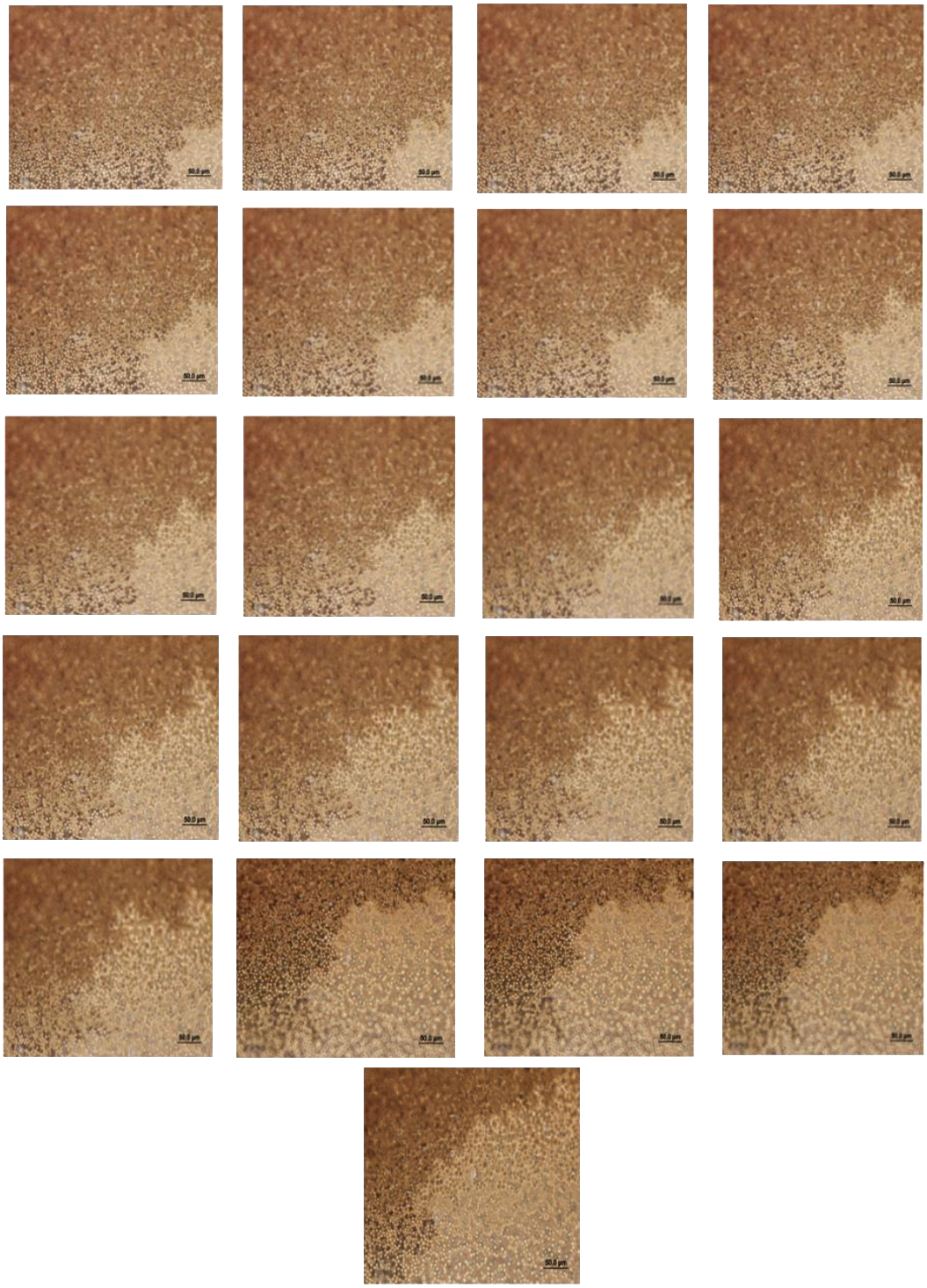


Fonte: Autoria Própria

A ação de filme hemostático e sua correlação com o movimento browniano foi estudada de maneira mais detalhada num experimento à parte. Nesse caso, usando-se uma quantidade de volume de sangue 10x (20 µL) maior que os volumes inicias (2 µL), observou-se um rápido espalhamento das hemácias para dentro do filme hemostático e a medida que o tempo transcorre a absorção é proporcional a quantidade do cálcio utilizado

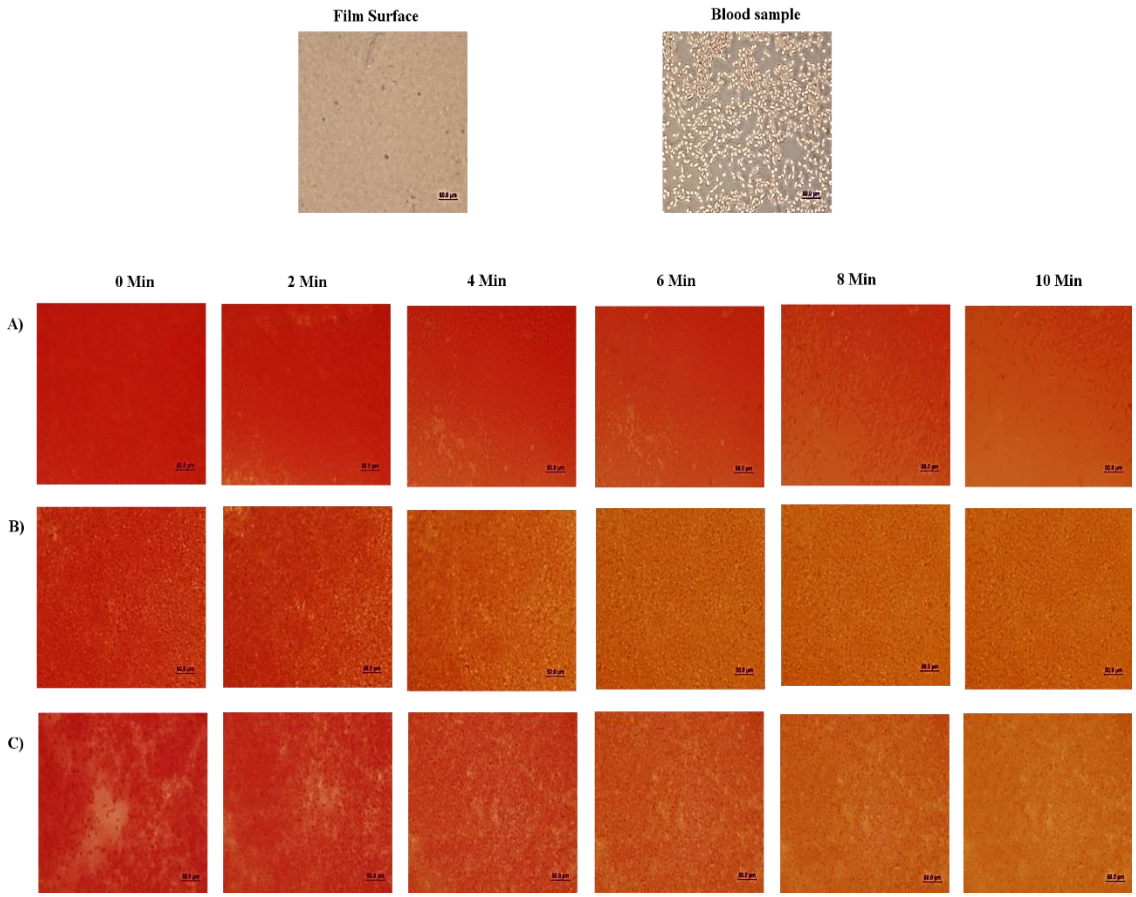
na reticulacão dos filmes. Observa-se também, uma degradação na coloração do filme hemostático (Fig. 29): a coloração inicial vermelha (hemácias livres na superfície do filme) até uma coloração alaranjada (indicação de retenção do movimento browniano das moléculas de sangue e sua imediata ativação da cascata de coagulação). Essa evolução é nítida quando se observa a evolução dessas reações para o filme sem reticulação (PEG-PEC) e os filmes reticulados.

Figura 26. PEC-PEG-Ca-3. Imagens coletadas, a cada 10 segundos, para a amostra PEC-PEG-Ca-3 a partir do que ocorre no intervalo de 2-4 minutos



Fonte: Autoria Própria

Figura 27. Microscopia de contraste dos filmes reticulados em tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 10 min 20 µl do sangue: A) PEC-PEG-Ca-0.5, B) PEC-PEG-Ca-3, C) PEC-PEG-Ca- 5



Fonte: Autoria Própria

6.8 Tromboelastografia (TEG)

A tromboelastografia (TEG) permite avaliar as propriedades elásticas do sangue fornecendo uma avaliação global da função hemostática. As alterações que ocorrem durante a coagulação são registradas, fornecendo uma representação gráfica do processo de polimerização da fibrina e também da força do coágulo. A diferencia da análise tromboelastografica em relação aos ensaios de coagulação de rotina empregados em hospitais e laboratórios de análises médicas, tais como TTPA (tempo de tromboplastina parcial ativada) e TP (tempo de protrombina) é que o TTPA e o TP não feitos usando o sangue humano total, pois estes testes são realizados apenas com o plasma sanguíneo .

Assim sendo, a contribuição de plaquetas para a resistência e formação do coágulo não são considerados. Enquanto TP e o TTPA são rotineiramente empregados para detecção de distúrbios da coagulação sanguínea e permitem a indicação de medicamentos para o tratamento, controle e monitoramento desses distúrbios, na prática essas analises oferecem uma visão bastante simplista do complexo processo envolvido na coagulação sanguínea e dos parâmetros globais envolvidos nesse processo.

Nessa seção os tromboelastrogramas são avaliados em relação aos parâmetros (R, K, α, MA) para os testes controle, *Quick culto* e os filmes de pectinas.

A) **Filmes de Pectina PEG (PEC-PEG)**

Na tabela 2 são apresentados os parâmetros experimentais R, K, α , MA obtidos para as amostras *Controle, Quick Clot e PEC_PEG.*

Os filmes não reticulados de Pectina com Polietilenoglicol PEC_PEG, apresentaram um tempo de reação (R= 8.5± 0.25) similar ao *Controle* feito no processo (R=8.6), tornando evidente diferença do tempo de reação (R=3.3 ± 0.29) em relação agente hemostatico comercial (*Quick Clot*), pois seu temopo de reação é 3 vezes (3x) menor que o tempo de reação do PEC-PEG. O o tempo de formação de coagulo (K =2.9± 0.14) para o PEC-PEG é menor que o tempo de formação do coagulo para o *Controle* e do *Quick Clot* em quase um minuto (vide tabela 1). A tendencia da cinetica do formação do coágulo (α = 52.2± 0.29) para os filmes PEC_PEG é similar ao apresentado pelo *Quick Clot*. Finalmente a consistência elástica do coágulo dos filmes PEC_PEG (MA=57.4± 0.21), apresenta um parâmetro mais favorável em comparação com o *Quick Clot* e o *Controle*.

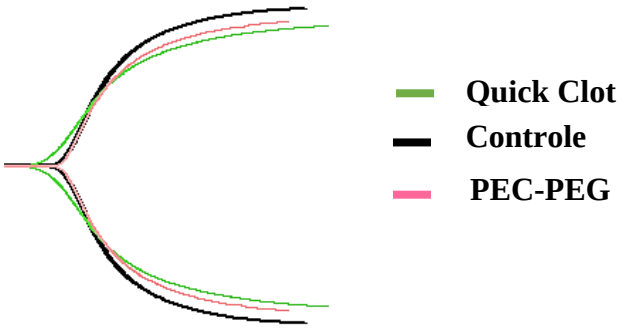
A figura 30 mostra o comparativo dos tromboelastrogramas dos filmes PEC_PEG, com o *Controle* e o agente comercial hemostático *Quick Clot.*

Tabela 2. Parâmetros Tromboelastograficos dos parâmetros R, K, α e MA das amostras Controle, Quick Clot e PEC-PEG

Amostra	***R (min)***	***K (min)***	***α (°)***	***MA (mm)***
Controle	8.6 ± 0.27	3.7 ± 0.2	32.3 ± 2.4	51.1 ± 3.6

Quick Clot	3.3 ± 0.29	3.8 ± 0.18	58.4 ± 2.1	50.4 ± 0.6
PEC-PEG	8.5± 0.25	2.9± 0.14	52.2± 0.29	57.4± 0.21

Figura 28. Comparação dos tromboelastrogramas dos filmes de PEC-PEG com respeito aos ensaios Controle e Quick Clot



Fonte: Autoria Própria

B) **Filmes de Pectina com 0,5% de Cálcio (PEC-PEG-Ca-0.5)**

Na tabela 3 são apresentados os parâmetros experimentais R, K, α, MA obtidos para as amostras *Controle, Quick Clot e PEC-PEG-Ca-05.*

O parâmetro R obtido para a amostra PEC-PEG-Ca-05 (R=7.4 ± 0.23 min) é maior que o parâmetro obtido para a amostra comercial *Quickclot* (R= 3.3 ± 0.29 min) indicando sua pouca eficiência em relação ao agente hemostático *Quickclot*. Todavia, em comparação com o parâmetro obtido para amostra controle (R= 8.6 ± 0.27 min) pode-se detectar uma ação hemostática.

O parâmetro de formação de coágulo para os filmes PEC-PEG-Ca-0.5 (K=3.4 ± 0.12 min) é similar aos valores obtidos para a amostra *Controle* e o agente hemostático comercial *Quickclot.* A tendencia cinética de formação dos coágulos para os filmes PEC-PEG-0.5 (α =49.1 ± 1.7 °) tem um valor de quase 10 graus menos com respeito ao agente comercial (α =58.4 ± 2.1°), mas apresenta um valor maior considerável para o ensaio Controle.

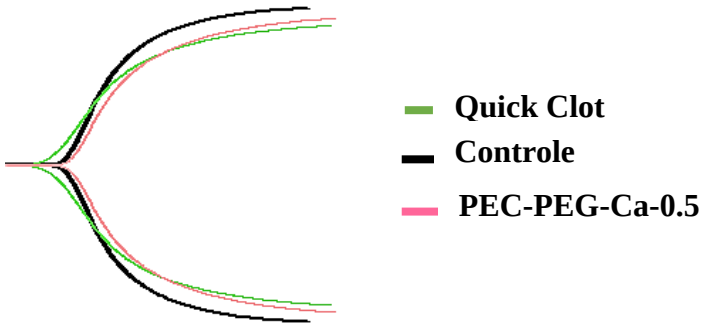
A consistência elástica dos coágulos (MA=57.3 ± 0.8 mm) para os filmes PEC-PEG-Ca-0.5 permanece constantes enquanto ao filme de PEC-PEG, apresentado anteriormente.

A figura 31 mostra o comparativo dos tromboelastrogramas dos filmes PEC-PEG-Ca-0.5, com o *Controle* e o agente comercial hemostático *Quick Clot.*

Tabela 3. Parâmetros Tromboelastograficos dos parâmetros R, K, α e MA das amostras Controle, Quick Clot e PEC-PEG-Ca-0.5

Amostra	*R (min)*	*K (min)*	*α (°)*	*MA (mm)*
Controle	8.6 ± 0.27	3.7 ± 0.2	32.3 ± 2.4	51.1 ± 3.6
Quick Clot	3.3 ± 0.29	3.8 ± 0.18	58.4 ± 2.1	50.4 ± 0.6
PEC-PEG-Ca-0.5	7.4 ± 0.23	3.4 ± 0.12	49.1 ± 1.7	57.3± 0.8

Figura 29. Comparação dos tromboelastrogramas dos filmes de PEC-PEG-Ca-0.5 com respeito aos ensaios Controle e Quick Clot



Fonte: Autoria Própria

C) **Filmes de Pectina com 3% de Cálcio (PEC-PEG-Ca-3)**

Na tabela 4. Se apresentam os valores registrados para os parâmetros R, K, α, MA, das amostras *Controle, Quick Clot e* PEC-PEG-Ca-3.

O parâmetro de reação (R=6.9 ± 0.26 min) dos filmes de PEC-PEG-Ca-3 com respeito ao *Controle* é menor em quase 2 min. Particularmente esta amostra apresenta um tempo

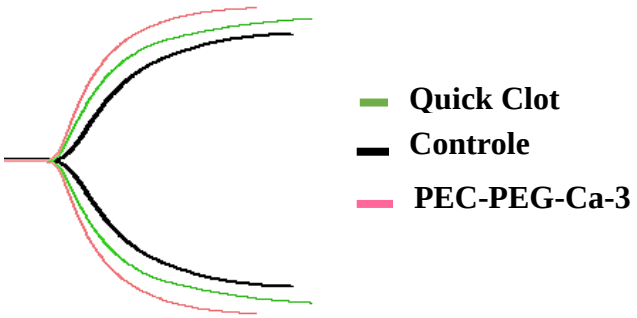
de formação do coágulo bastante rápido (K=2.4 ± 0.17 min), inclusive é menor por mais de 1 minuto que o agente hemostático comercial *Quick Clot* (K=3.8 ± 0.18 min). Para esta amostra se evidencia o aumento da capacidade de diminuição cinética dos coágulos (α =55.6 ± 1 °) sendo este valor próximo do agente comercial (α =58.4 ± 2.1°). A consistência elástica dos filmes (MA=60.9 ± 2.3 mm) PEC-PEG-Ca-3 aumenta consideravelmente e inclusive é maior em quase 1mm que o registro obtido da amostra do *Quick Clot* (MA=50.4 ± 0.6 mm).

A figura 32 mostra o comparativo dos tromboelastrogramas dos filmes PEC-PEG-Ca-3, com o *Controle* e o agente comercial hemostático *Quick Clot.*

Tabela 4. Parâmetros Tromboelastograficos dos parâmetros R, K, α e MA das amostras Controle, Quick Clot e PEC-PEG-Ca-3

Amostra	*R (min)*	*K (min)*	*α (°)*	*MA (mm)*
Controle	8.6 ± 0.27	3.7 ± 0.2	32.3 ± 2.4	51.1 ± 3.6
Quick Clot	3.3 ± 0.29	3.8 ± 0.18	58.4 ± 2.1	50.4 ± 0.6
PEC-PEG-Ca-3	6.9 ± 0.26	2.4 ± 0.17	55.6 ± 1	60.9 ± 2.3

Figura 30. Comparação dos tromboelastrogramas dos filmes de PEC-PEG-Ca-3 com respeito aos ensaios Controle e Quick Clot



Fonte: Autoria Própria

D) **Filmes de Pectina com 5% de Cálcio (PEC-PEG-Ca-5)**

Na tabela 5. Se apresentam os valores registrados para os parâmetros R, K, α, MA, das amostras *Controle, Quick Clot e* PEC-PEG-Ca-5**.**

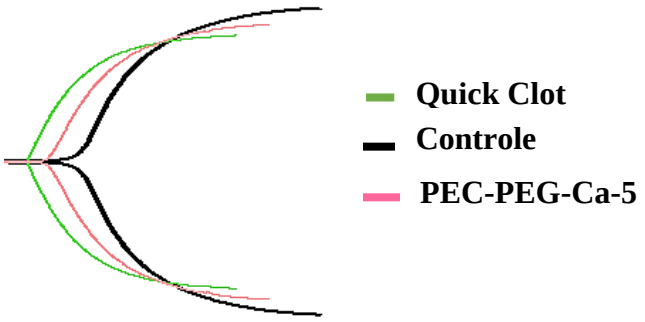
A redução do tempo de reação (R=5.1 ± 0.21 min) dos filmes de PEC-PEG-Ca-5 é menor por quase 4 min com respeito ao *Controle* e sendo o menor valor de reação dos filmes reticulados e valor mais próximo do *Quick Clot* (R= 3.3 ± 0.29 min). O tempo de formação do coágulo (K=3.1 ± 0.15 min) é menor enquanto a amostra do agente comercial hemostático *Quick Clot* (K=3.8 ± 0.18 min). A capacidade de diminuição cinética dos coágulos (α =53.1 ± 1.4 °) se apresenta similar com respeito ao valor obtido para agente hemostático comercial (α =58.4 ± 2.1 °). A força de formação do coágulo (MA=59.9 ± 1.6 mm) para os filmes de PEC-PEG-Ca-5 apresenta um valor maior enquanto ao *Quick Clot* (MA=50.4 ± 0.6 mm) demostrando uma tendencia favorável para todos os filmes reticulados testados.

A figura 33 mostra o comparativo dos tromboelastrogramas dos filmes PEC-PEG-Ca-5, com o *Controle* e o agente comercial hemostático *Quick Clot.*

Tabela 5.Parâmetros Tromboelastograficos dos parâmetros R, K, α e MA das amostras Controle, Quick Clot e PEC-PEG-Ca-5

Amostra	*R (min)*	*K (min)*	*α (°)*	*MA (mm)*
Controle	8.6 ± 0.27	3.7 ± 0.2	32.3 ± 2.4	51.1 ± 3.6
Quick Clot	3.3 ± 0.29	3.8 ± 0.18	58.4 ± 2.1	50.4 ± 0.6
PEC-PEG-Ca-5	5.1 ± 0.21	3.1 ± 0.15	53.1 ± 1.4	59.9 ± 1.6

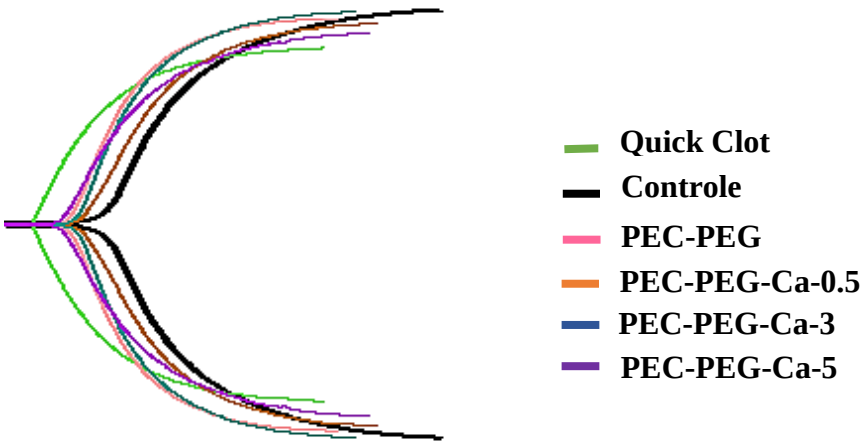
Figura 31. Comparação dos tromboelastrogramas dos filmes de PEC-PEG-Ca-3 com respeito aos ensaios Controle e Quick Clot



Fonte: Autoría Propria

A figura 34 mostra os tromboelastrogramas dos ensaios descritos anteriormente, mostrando principalmente no início do traço as diferencias dos tempos de reação dos materiais especialmente, além pode se observar a tendencia dos traços os quais ajudam, além dos dados da medição tromboelastografica, a determinar o efeito hemostático dos filmes a base de pectina

Figura 32. Comparação dos Tromboelastogramas dos ensaios descritos dos filmes a base de Pectina e sua comparação com Controle e o agente hemostático Quick Clot



Fonte: Autoria própria.

Foram analisados os respectivos tromboelastrograma obtidos para os filmes a base de pectina e seus respectivos parâmetros hemostáticos em relação ao agente hemostático comercial com um agente comercial hemostático *Quick Clot.*

Os filmes não reticulados (PEC-PEG) apresentaram um tempo de reação (R) para início da coagulação (R) bastantes similares a uma reação de um sangramento comum, mas sua capacidade para agrupar as hemácias e formar o coágulo (K) é alta. Quando estes filmes

conseguem reagir dentro da cascata de coagulação, a capacidade de diminuição cinética dos coágulos (α) é alta e quase parecida ao agente *Quick Clot,* assim mesmo o valor de contenção da força do coágulo (MA) é maior que suas amostras comparativas.

Para os filmes reticulados PEC-PEG-Ca-0.5, PEC-PEG-Ca-3 e PEC-PEG-Ca-5 o tempo de reação (R) para o início do processo hemostático, vai diminuindo proporcionalmente à quantidade de cálcio presentes na matriz, sendo o filme PEC-PEG-Ca-5 quem teve o melhor valor deste parâmetro comparado com o agente hemostático

Quick Clot. Se tem que ter em conta que os valores não chegaram a ser próximos aos valores do *Quick Clot,* são menores enquanto o *Controle,* o qual a partir dos dois minutos de diferença já pode ser considerado como um agente hemostático. Além, se deve ter em consideração que nestes experimentos foram testados os filmes em formato quadriculado o qual a área superficial de interação com o sangue é significativamente menor, enquanto o *Quick Clot¸* antes de ser inserido para o processo tromboelastográfico, incialmente se apresenta em esferas milimétricas o qual depois foi pulverizado ajudando ao se esparzir homogeneamente dentro do *cup* do TEG garantindo uma rápida interação com o sangue, tendo uma vantagem considerável especialmente neste parâmetro.

Quando os filmes reticulados reagem e interatuam na cascata de coagulação, podem se observar valores similares ou ainda melhores que o agente comercial hemostático *Quick Clot,* especialmente na capacidade de agrupação das hemácias para iniciar a formação do coágulo (K) e a força elástica dos coágulos (MA) que ajudam a conter o sangramento e assim ajudar na promoção da fibrina dentro da via comum da cascata de coagulação.

6.9 Discussão dos resultados tromboelastograficos obtidos com os filmes preparados nesse estudo em comparação com literatura cientifica e patentária.

Pesquisas recentes reportam materiais hemostáticos descrevendo compostos híbridos incluindo a pectina dentro de seu processo como foi descrito por *Wang et al*.(WANG et al., 2021), onde desenvolveram uma matriz mista entre gelatina de origem porcino, metacrilato anidrido e pectina de cascas de laranja, usando além, quantidades controladas de cloreto de cálcio com a finalidade de obter uma reticulação entre os grupos

carboxila da pectina, reforçando a possível ação hemostática do material. Finalmente é obtido um tópico hemostático em forma de gel incoloro e homogêneo. O efeito hemostático destes géis reportado por Wang et al. descreve a alta capacidade de produção de trombina para promover a formação da fibrina, causado principalmente pela quantidade de interações reticuladas produzidas pelas interações do cálcio não só com a pectina, se não com a gelatina. O método para demostrar o efeito hemostático dos materiais foi mediante a medição do tempo de reação. Inserindo uma quantidade dos hidrogéis em 1ml do sangue de ovelha com 0.02M de $CaCl_2$ em um tubo de *Eppendorf* virando o tubo cada 10 segundos até que se consiga observar que o hidrogel fique estático ou não dessa na hora de virar o tubo. Esses tempos sãos registrados e comparados com estudos prévios (SEMBEROVA et al., 2009; WANG et al., 2017b)determinando que o agente hemostático desenvolvido atua como reforço da trombina ajudando a promoção da fibrina.

Um segundo agente hemostático hibrido incluindo a pectina dentro de sua sínteses foi reportado por Sutar et al. (SUTAR et al., 2021) onde desenvolvem um curativo hemostático feito de uma matriz de pectina e alginato tendo como base micro fibras da planta *Croton oblongifolius*, reforçando fisicamente o dispositivo com pericárdio bovino, além usam $CaCl_2$ para fazer *cross-linking* entre os grupos carboxila disponíveis tanto da pectina como o alginato, e assim otimizar o processo de coagulação. Finalmente é obtido uma matriz em forma de filme de consistência homogênea. O teste hemostático reportado pelo Sutar et al. foi usado para determinar a eficiência de coagulação do sangue. Foram cortados curativos de 1x1 cm^2, misturando-os dentro de um tubo falco com 20 µL de sangue tratada com anticoagulante de 2% de EDTA 9:1 (v/v) e 0.2 M de $CaCl_2$, aquecendo o tubo a 37 °C e sendo agitados a 30 rpm por 10 min. Finalmente retiram o excesso do sangue que não fica coagulada na matriz com água e determinam a absorbância de hemoglobinas por médio de UV a 540 nm, determinando assim o índice de coagulação do sangue para os filmes desenvolvidos. Neste trabalho consegue determinar que esta matriz tem a ação hemostática baseada na promoção de fibrina dentro da cascata de coagulação.

Os resultados reportados pela literatura apresentam apenas uma técnica cada um para determinar um parâmetro hemostático relacionado diretamente com a reação do material para iniciar a formação dos coágulos, com o qual conseguem definir a ação hemostática dos materiais híbridos baseados em pectina. Este foi o único parâmetro

descrito no trabalho de Wang et al. tangível que pode ser comparado com os filmes de pectina descritos neste trabalho. Enquanto o trabalho de Sutar et al. apresenta quantidades estáticas baseadas em porcentagem de absorção de hemácias para descrever a ação hemostática do material, com o qual não foi possível ter um comparativo com respeito aos parâmetros obtidos pelo TEG.

Na tabela 6 descrevem os tempos de reação dos materiais (R) para os filmes híbridos de pectina descritos pelo Wang et al. identificados como GelCa0mM, GelCa5mM e GelCa10mM, os quais são os géis obtidos com a quantidade em milimolar do cálcio usado na sínteses com seu respetivo tempo de controle, sendo comparado com os filmes base a de pectina PEC-PEG, PEC-PEG-Ca 0.5, PEC-PEG-Ca 3 e PEC-PEG- 5.

Tabela 6. Comparação dos tempos de reação de materiais a base de Pectina Híbridos e filmes a base de Pectina

	Controle	**GelCa0mM**	**GelCa5mM**	**GelCa10mM**	**Controle**	**PEC-PEG**	**PEC-PEG-Ca 3**	**PEC-PEG-5**
Tempo de Reação (R)min	9.45	6.27	6.04	6	8.6	7.4	6.9	5.1

Dentro do processo dos materiais híbridos de pectina foi determinado que esse tipo de agentes são promotores de fibrina.

A vantagem do uso da técnica de Tromboelastografía é que pode definir o processo hemostático desde a reação do material até a formação da matriz de fibrina, tendo a possibilidade de descrever os processos que estejam relacionados dentro da cascata de coagulação e quais são os fatores principais onde o material testado está interagindo, consolidando o processo com um rigor científico mais preciso. A globalização desse processo por médio de uma técnica como o TEG permite consolidar a

ação hemostática dos materiais ensaiados, o caso específico, os filmes a base de pectina descritos neste trabalho.

Outros trabalhos com famílias de biopolímeros como agentes hemostáticos usaram o TEG como técnica de medição da ação hemostática dos seus materiais. Huang et al. (HUANG et al., 2017) reporta a ação hemostática de esponjas hibridas a base de quitosana. Para medir os parâmetros tromboelastograficos, foram dispostos os géis das soluções sem liofilizar. Na tabela 7 se apresentam os dados do TEG dos compostos hemostáticos a base de quitosana (HM-CH1, HM-CH2, HM-CH3 e HM-CH4) apresentados no trabalho de Huang et al. comparados com os dados obtidos dos filmes a base de pectina.

Tabela 7. Comparação dos parâmetros Tromboelastograficos de agentes hemostáticos híbridos a base de quitosana com filmes a base de pectina

	R (min)	***K (min)***	***α (°)***	***MA (mm)***
Controle	8.5	3.5	53	50
HM-CH1	8.1	2.7	54.9	56.8
HM-CH2	5.8	1.7	66.4	63.5
HM-CH3	5.6	1.4	69.4	57.0
HM-CH4	3.0	1.6	67.6	67.1
Controle	8.6	3.7	32.3	51.1
PEC-PEG	8.5	2.9	52.2	57.4
PEC-PEG-Ca-0.5	7.4	3.4	49.1	57.3
PEC-PEG-Ca-3	6.9	2.4	55.6	60.9
PEC-PEG-Ca-5	5.1	3.1	53.1	59.9

É notável que os parâmetros tromboelastograficos para a formação do coagulo (K) e a capacidade de redução cinética dos coágulos (α) favorecem aos compostos híbridos a base de quitosana, lembrando que para o caso dos materiais a base de pectina foram testados no formato físico do filme, não o hidrogel base, assim como foi reportado

no trabalho de Huang *et al*. Além os tempos de formação do coagulo (K), são favoráveis para os hemostáticos a base de quitosana, isto é por causa do uso das zeolitas usadas na sínteses, as quais favorecem a absorção é rápida coagulação.

O trabalho reportado por Pan *et al*. (PAN et al., 2018) onde a quitosana é usada como agente hemostático apresentando uma sínteses com uma matriz de alginato de zinco. Pan *et al*. reporta o desenvolvimento de microesferas de quitosana gotejando o biopolímeros em uma emulsão formando microesferas numa temperatura aproximada aos 40 °C comparando com outro grupo de microesferas as quais incluem alginato de zinco e depois são testadas pela técnica do TEG.

Testes hemostáticos com TEG foram realizados para os dois grupos de microesferas obtidos. Para este trabalho reportado pelo Pan et al. não tiveram em conta o parâmetro da força de contenção dos coágulos (MA), razão pela qual se comparam apenas 3 parâmetros apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Comparação dos parâmetros Tromboelastograficos de microesferas de Quitosana com os Filmes de Pectina

	R(min)	***K(min)***	***α (°)***
Controle	5.1 ± 0.1	5.4 ± 0.9	37.9 ± 3.1
CHMS	4.2 ± 0.1	4.7 ± 0.4	40.4 ± 2.1
ZnCHAlg	3.6 ± 0.1	4.2 ± 0.8	41.7 ± 6.7
Controle	8.6 ± 0.27	3.7 ± 0.2	32.3 ± 2.4
PEC-PEG	8.5± 0.25	2.9± 0.14	52.2± 0.29
PEC-PEG-Ca-0.5	7.4 ± 0.23	3.4 ± 0.12	49.1 ± 1.7
PEC-PEG-Ca-3	6.9 ± 0.26	2.4 ± 0.17	55.6 ± 1
PEC-PEG-Ca-5	5.1 ± 0.21	3.1 ± 0.15	53.1 ± 1.4

Os parâmetros comparativos apresentados demostram uma vantagem considerável por parte dos filmes de Pectina, obtendo tempos de reação (R) menores, formam coágulos (K) mais rapidamente que as microesferas e a diminuição da cinética dos coágulos (α) é favorável para as pectinas.

Com base nos resultados experimentais obtidos neste estudo é razoável afirmar que o mecanismo do *Glass-Effect* também faz parte do processo. De acordo com a literatura o *Glass-Effect* é a observação geral de que o sangue coagula mais rapidamente quando em contato com superfícies polares do que com superfícies apolares nas quais a energia/polaridade da superfície hemostática determina a “molhabilidade” do agente hemostático no sangue, ajudando a absorver o componente fluido do mesmo , portanto, concentra os fatores de coagulação no local da lesão e ativando a via intrínseca da coagulação (KAUR et al., 2014; NAGRATH et al., 2021; OSTOMEL et al., 2007). A rede de pectina reticulada com íons cálcio auxilia na distribuição das plaquetas absorvidas dentro do filme, favorecendo a ativação da cascata de coagulação e a formação precoce de trombina (WU et al., 2020).

7. CONCLUSÕES

As conclusões dessa pesquisa de doutorado são:

- Obtenção de filmes a base de pectina e seu respectivo processo de reticulação indireta com íons de cálcio, conferiram a conformação de estruturas tipo "*Egg-box*"

- A medida que incrementa a quantidade de cálcio nos filmes reticulados, a sua ação hemostática é mais efetiva

- Foi determinada a ação hemostática da pectina não hibrida, obtendo o primer estudo e análises deste biomaterial abundante na biomassa do Brasil, dentro dessa grande área da saúde.

- Os materiais reticulados a base de pectina, obtiveram valores nos parâmetros de coagulação similares e superiores a agentes hemostáticos híbridos a base de pectina e outros biopolímeros, inclusive de agentes hemostáticos comerciais como o *Quick Clot.*

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Em vista dos resultados experimentais aqui descritos, surgem uma serie de perspectivas que ajudariam a complementar profundamente o trabalho apresentado. Dentro dessas possíveis podem ser:

- Testes *in vivo* em animais e humanos, com a colaboração da Faculdade de Veterinária da Universidade de Rio Preto (UNIRP) e a Faculdade de Medicina de Rio Preto (FAMERP)

- Avaliação do modelo matemático para a descrição do efeito de *"Swelling Efect"* apresentado pelos filmes. Este trabalho será realizado com a ajuda do professor Dr. Andrew Hazel, da Escola de Matemáticas da Universidade de Manchester, Inglaterra.

- Exploração comercial da patente com empresas que trabalhem com esse tipo de Biomassa como é a Pectina, caso específico com a multinacional Cargill.

REFERENCIAS

ABDULLAH, A.; MOHAMMED, A. Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. **International Conference on Hydraulics and Pneumatics**, [s. l.], n. January, p. 1–9, 2019.

ADAMS, R. L. C.; BIRD, R. J. **Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants**, 2009.

ALTINTOP, İ.; TATLI, M.; SOYER, Z.; YAY, A. H.; ÖZTÜRK, A.; KARAKÜKÇÜ, Ç. A novel hemostatic scaffold material and the importance of scaffold formation on ending hemorrhage: An experimental rat study. **Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 163–170, 2020.

ASSIFAOUI, A.; LERBRET, A.; UYEN, H. T. D.; NEIERS, F.; CHAMBIN, O.; LOUPIAC, C.; COUSIN, F. Structural behaviour differences in low methoxy pectin solutions in the presence of divalent cations (Ca2+and Zn2+): A process driven by the binding mechanism of the cation with the galacturonate unit. **Soft Matter**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 551–560, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C4SM01839G>

BAKER, S. E.; SAWVEL, A. M.; ZHENG, N.; STUCKY, G. D. Controlling bioprocesses with inorganic surfaces: Layered clay hemostatic agents. **Chemistry of Materials**, [s. l.], v. 19, n. 18, p. 4390–4392, 2007.

BALCI, M. **Basic ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectroscopy**. [s.l: s.n.].

BALDOCK, J. A.; OADES, J. M.; NELSON, P. N.; SKENE, T. M.; GOLCHIR, A.; CLARKE, P. Assessing the extent of decomposition of natural organic materials using solid-state 13C NMR spectroscopy. **Australian Journal of Soil Research**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 1061–1083, 1997.

BECKER, R. C. Cell-based models of coagulation: A paradigm in evolution. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, [s. l.], 2005.

BEMILLER, J. N. An introduction to pectins: structure and properties. In: ACS SYMPOSIUM SERIES-AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (USA) 1986, **Anais**... [s.l: s.n.]

BESSEY, P. Q. The role of alginate dressings in wound healing. **Total Burn Care**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 127–135, 2007.

BOLLIGER, D.; SEEBERGER, M. D.; TANAKA, K. A. Principles and Practice of Thromboelastography in Clinical Coagulation Management and Transfusion Practice. **Transfusion Medicine Reviews**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 1–13, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmrv.2011.07.005>

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular basis of Ca2+-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 1089–1096, 2001.

BRACEY, A.; SHANDER, A.; ARONSON, S.; BOUCHER, B. A.; CALCATERRA, D.; CHU, M. W. A.; CULBERTSON, R.; JABR, K.; KEHLET, H.; LATTOUF, O.; MALAISRIE, S. C.; MAZER, C. D.; OBERHOFFER, M. M.; OZAWA, S.; PRICE, T.;

ROSENGART, T.; SPIESS, B. D.; TURCHETTI, G. The Use of Topical Hemostatic Agents in Cardiothoracic Surgery. **The Annals of Thoracic Surgery**, [s. l.], v. 104, n. 1, p. 353–360, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2017.01.096>

BRUCKNER, B. A.; NGO, U.; RAMCHANDANI, M.; SUAREZ, E.; AWAD, S.; REARDON, M. Application techniques of a novel hemostat in cardiac operations: HEMOBLAST. **Journal of Cardiac Surgery**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 849–853, 2019.

BU, Y.; PANDIT, A. Cohesion mechanisms for bioadhesives. **Bioactive Materials**, [s. l.], v. 13, n. October 2021, p. 105–118, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.11.008>

BU, Y.; ZHANG, L.; LIU, J.; ZHANG, L.; LI, T.; SHEN, H.; WANG, X.; YANG, F.; TANG, P.; WU, D. Synthesis and Properties of Hemostatic and Bacteria-Responsive in Situ Hydrogels for Emergency Treatment in Critical Situations. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [s. l.], v. 8, n. 20, p. 12674–12683, 2016.

CAO, L.; LU, W.; MATA, A.; NISHINARI, K.; FANG, Y. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 242, n. January, p. 116389, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116389>

CARVALHO, M. V. H. De; MARCHI, E. Mechanism of action of topical hemostatic and adhesive tissue agents. **Revista Médica de Minas Gerais**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 488–493, 2013.

CHARLES W. WHITTEN, M.D.; PHILIP E. GREILICH, M. . Thromboelastography® Past, Present, and Future. **Anesthesiology**, [s. l.], v. 92, n. 5, p. 1–8, 2000.

CHRISTENSEN, S. H.; PECTINS, M. G. **Food Hydrocolloids, Vol. 3**, IIICRC Press, Boca Raton, FL, 1986.

CIPRIANI, T. R.; GRACHER, A. H. P.; DE SOUZA, L. M.; FONSECA, R. J. C.; BELMIRO, C. L. R.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. **Thrombosis and haemostasis**, [s. l.], v. 102, n. 05, p. 860–866, 2009.

COAGUILA LLERENA, H.; MENDIOLA AQUINO, C. **Agentes hemostáticos en cirugía periapical: Revisión de literatura** , scielo , 2015.

DE VRIES, J. A. Structural features of apple pectic substances. **Doctoral Thesis, Wageningen (agricultural UniversityI**, [s. l.], 1983. Disponível em: <file://reinette/bdd/BaseBiblio/Photocopies/8833.pdf>

E. BRETMAIER, W. V. **Carbon 13-C NMR Spectroscopy**. 3rd. ed. Stutgart: VCH Verlagsgellschaft, 1995. v. 6

FARES, M. M.; SHIRZAEI SANI, E.; PORTILLO LARA, R.; OLIVEIRA, R. B.; KHADEMHOSSEINI, A.; ANNABI, N. Interpenetrating network gelatin methacryloyl (GelMA) and pectin-g-PCL hydrogels with tunable properties for tissue engineering. **Biomaterials Science**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. 2938–2950, 2018.

FARNDALE, R. W.; SIXMA, J. J.; BARNES, M. J.; DE GROOT, P. G. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [s.

l.], v. 2, n. 4, p. 561–573, 2004.

FARRIS, S.; SCHAICH, K. M.; LIU, L. S.; COOKE, P. H.; PIERGIOVANNI, L.; YAM, K. L. Gelatin-pectin composite films from polyion-complex hydrogels. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 61–70, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.05.006>

FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. D. O. A cell-based model of coagulation and its implications. **Revista brasilieira de hematologia e hemoterapia**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 416–421, 2010.

GALVEZ C., K.; CORTES L., C. Thromboelastography: New concepts in haemostasis physiology and correlation with trauma associated coagulopathy. **Colombian Journal of Anesthesiology**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 224–230, 2012. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S225620871200003X>

GALVEZ C., K.; CORTES L., C.; FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. de O.; DUSSE, L. M. S.; CARVALHO, M. das G. Thromboelastography: New concepts in haemostasis physiology and correlation with trauma associated coagulopathy. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 416–421, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000500016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>

GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; SMITH, P. J. C.; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 195–198, 1973.

GRANVILLE-CHAPMAN, J.; JACOBS, N.; MIDWINTER, M. J. Pre-hospital haemostatic dressings: A systematic review. **Injury**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 447–459, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2010.09.037>

HAEMONETICS CORPORATION. TEG 5000 Hemostasis analyzer system. [s. l.], p. 3–5, 2011.

HEWITT, C. W.; MARRA, S. W.; KANN, B. R.; TRAN, H. S.; PUC, M. M.; CHRZANOWSKI, F. A.; TRAN, J. L. V.; LENZ, S. D.; CILLEY, J. H.; SIMONETTI, V. A.; DELROSSI, A. J. BioGlue surgical adhesive for thoracic aortic repair during coagulopathy: Efficacy and histopathology. **Annals of Thoracic Surgery**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 1609–1612, 2001.

HUANG, Y.; FENG, L.; ZHANG, Y.; HE, L.; WANG, C.; XU, J.; WU, J.; KIRK, T. B.; GUO, R.; XUE, W. Hemostasis mechanism and applications of N-alkylated chitosan sponge. **Polymers for Advanced Technologies**, [s. l.], v. 28, n. 9, p. 1107–1114, 2017.

ISLAM SARKER, M. Z.; ABD ELGADIR, M.; FERDOSH, S.; AKHTAR, M.; ZAINUL ABEDIN, M.; ABDUL HAKIM, M.; NODA, T. The impact of biopolymers on thermal behavior of meat-biopolymer mixtures- Differential scanning calorimetry (DSC) study. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, [s. l.], v. 11, n. 3–4, p. 566–571, 2013.

JARVIS, M. C.; APPERLEY, D. C. Chain conformation in concentrated pectic gels: evidence from 13C NMR. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 275, n. 1, p. 131–145, 1995.

JIANG, Y.; XU, Y.; LI, F.; LI, D.; HUANG, Q. Pectin extracted from persimmon peel:

A physicochemical characterization and emulsifying properties evaluation. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 101, n. November 2019, p. 105561, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105561>

KATSARAS, G.; SOKOU, R.; TSANTES, A. G.; PIOVANI, D.; BONOVAS, S.; KONSTANTINIDI, A.; IOAKEIMIDIS, G.; PARASTATIDOU, S.; GIALAMPRINOU, D.; MAKROGIANNI, A.; MITSIAKOS, G.; TSANTES, A. The use of thromboelastography (TEG) and rotational thromboelastometry (ROTEM) in neonates: a systematic review. **European Journal of Pediatrics**, [s. l.], v. 180, n. 12, p. 3455–3470, 2021.

KAUR, G.; PANDEY, O. P.; SINGH, K.; HOMA, D.; SCOTT, B.; PICKRELL, G. A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 254–274, 2014.

KERTESZ, Z. I. **Pectic substances**. [s.l.] : Interscience Publishers, Inc.; New York, 1951.

KHAN, M. A.; MUJAHID, M. A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 124, p. 138–147, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.045>

KHEIRABADI, B. S.; ACHESON, E. M.; DEGUZMAN, R.; SONDEEN, J. L.; RYAN, K. L.; DELGADO, A.; DICK, E. J.; HOLCOMB, J. B.; ALAM, H. B. Hemostatic efficacy of two advanced dressings in an aortic hemorrhage model in swine. **Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 25–35, 2005.

KHEIRABADI, B. S.; MACE, J. E.; TERRAZAS, I. B.; FEDYK, C. G.; ESTEP, J. S.; DUBICK, M. A.; BLACKBOURNE, L. H. Safety evaluation of new hemostatic agents, smectite granules, and kaolin-coated gauze in a vascular injury wound model in swine. **Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 269–277, 2010.

KONERTZ, W. F.; KOSTELKA, M.; MOHR, F. W.; HETZER, R.; HÜBLER, M.; RITTER, J.; LIU, J.; KOCH, C.; BLOCK, J. E. Reducing the incidence and severity of pericardial adhesions with a sprayable polymeric matrix. **Annals of Thoracic Surgery**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 1270–1274, 2003.

KOONCE, S. L.; ECK, D. L.; SHADDIX, K. K.; PERDIKIS, G. A prospective randomized controlled trial comparing N-butyl-2 cyanoacrylate (Histoacryl), octyl cyanoacrylate (Dermabond), and subcuticular suture for closure of surgical incisions. **Annals of Plastic Surgery**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 107–110, 2015.

KUMAR, A.; CHAUHAN, G. S. Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (steapsin) inhibitor. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 454–459, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.001>

LAURENTI, J. B. **SÍNTESE DE AGENTES HEMOSTÁTICOS COAGULANTES E ANTIMICROBIANOS BASEADOS EM MATERIAIS ZEOLITÍCOS São José do Rio Preto SÍNTESE DE AGENTES HEMOSTÁTICOS COAGULANTES E São José do Rio Preto**. 2017. Universidade Estadual Paulista Julho Mezquita Filho, [s.

l.], 2017.

LAURENTI, J. B.; ZAZERI, G.; POVINELLI, A. P. R.; DE GODOY, M. F.; BRAILE, D. M.; DA ROCHA, T. R. F.; D'AMICO, É. A.; NERY, J. G. Enhanced pro-coagulant hemostatic agents based on nanometric zeolites. **Microporous and Mesoporous Materials**, [s. l.], v. 239, p. 263–271, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387181116304802>

LEITE, D. de O.; PRADO, R. J. Infrared spectroscopy: a presentation for high school students. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 1–9, 2012.

LENDLEIN, A.; KELCH, S. Shape-Memory Effect From permanent shape. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, [s. l.], v. 41, p. 2034–2057, 2002.

LEWIS, K. M.; SPAZIERER, D.; URBAN, M. D.; LIN, L.; REDL, H.; GOPPELT, A. Comparison of regenerated and non-regenerated oxidized cellulose hemostatic agents. **European Surgery - Acta Chirurgica Austriaca**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 213–220, 2013.

LI, D. qiang; LI, J.; DONG, H. lin; LI, X.; ZHANG, J. qi; RAMASWAMY, S.; XU, F. Pectin in biomedical and drug delivery applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 185, n. March, p. 49–65, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.088>

LICANDRO, G.; ODIO, C. E. 11 Citrus by-products. **Citrus: The genus citrus**, [s. l.], p. 159, 2002.

LIENING, D. A.; LUNDY, L.; SILBERBERG, B.; FINSTUEN, K. A comparison of the biocompatibility of three absorbable hemostatic agents in the rat middle ear. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, [s. l.], v. 116, n. 4, p. 454–457, 1997.

LIU, L. S.; FISHMAN, M. L.; KOST, J.; HICKS, K. B. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. **Biomaterials**, [s. l.], v. 24, n. 19, p. 3333–3343, 2003.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. [s.l.] : Editora E-papers, 2001.

MANJULADEVI, R.; SELVIN, P. C.; SELVASEKARAPANDIAN, S.; SHILPA, R.; MONIHA, V. Lithium ion conducting biopolymer electrolyte based on pectin doped with Lithium nitrate. **AIP Conference Proceedings**, [s. l.], v. 1942, 2018.

MARINHO, D. S. Perioperative hyperfibrinolysis – physiology and pathophysiology. **Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition)**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 65–75, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjane.2020.12.007>

MÁRMOL, Z.; PÁEZ, G.; RINCÓN, M.; ARAUJO, K.; AIELLO, C.; CHANDLER, C.; GUTIÉRREZ, E. Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones/Chitin and Chitosan friendly polymer. A review of their applications. **Revista Tecnocientífica URU**, [s. l.], n. 1, p. 53–58, 2013.

MISHRA, R. K.; DATT, M.; PAL, K.; BANTHIA, A. K. Preparation and characterization of amidated pectin based hydrogels for drug delivery system. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 2275–2280, 2008.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 266–277, 2008.

MOURA, T. De; BRAGA, S. **Tromboelastografia em pacientes estáveis em diálise peritoneal automatizada**. 2017. Universidade de São Paulo, [s. l.], 2017.

NAGRATH, M.; GALLANT, R.; YAZDI, A. R.; MENDONCA, A.; RAHMAN, S.; CHIU, L.; WALDMAN, S. D.; NI, H.; TOWLER, M. R. Tantalum-containing mesoporous bioactive glass powder for hemostasis. **Journal of Biomaterials Applications**, [s. l.], v. 35, n. 8, p. 924–932, 2021.

NEUFFER, M. C.; MCDIVITT, J.; ROSE, D.; KING, K.; CLOONAN, C. C.; VAYER, J. S. Hemostatic dressings for the first responder: a review. **Military medicine**, [s. l.], v. 169, n. 9, p. 716–720, 2004.

NISHIYAMA, Y.; MIRIAM, M.; LIMA, D. S. X-Ray Scattering and Diffraction of Biopolymers. In: SABU THOMAS, DOMINIQUE DURAND, CHRISTOPHE CHASSENIEUX, P. J. (Ed.). **Handbook ofBiopolymer-Based Materials: From Blends and Composites to Gels and Complex Networks**. First edit ed. [s.l.] : Wiley, 2013. p. 567–581.

NOH, J.; KIM, J.; KIM, J. S.; CHUNG, Y. S.; CHANG, S. T.; PARK, J. Microencapsulation by pectin for multi-components carriers bearing both hydrophobic and hydrophilic active agents. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 182, n. November 2017, p. 172–179, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.026>

NOREEN, A.; NAZLI, Z. i. H.; AKRAM, J.; RASUL, I.; MANSHA, A.; YAQOOB, N.; IQBAL, R.; TABASUM, S.; ZUBER, M.; ZIA, K. M. Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 101, p. 254–272, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.029>

NOVOSEL'SKAYA, I. L.; VOROPAEVA, N. L.; SEMENOVA, L. N.; RASHIDOVA, S. S. Trends in the science and applications of pectins. **Chemistry of Natural Compounds**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 1–10, 2000.

OAKENFULL, D. G. The chemistry of high-methoxyl pectins. **The chemistry and technology of pectin**, [s. l.], p. 87–108, 1991.

OSTOMEL, T. A.; SHI, Q.; STOIMENOV, P. K.; STUCKY, G. D. Metal oxide surface charge mediated hemostasis. **Langmuir**, [s. l.], v. 23, n. 22, p. 11233–11238, 2007.

PAIXÃO, J. P. M. **DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS COMPÓSITAS DE BIOPOLÍMEROS PARA A METANÓLISE DE ÁCIDOS GORDOS**. 2018. Universidade Nova de Lisboa, [s. l.], 2018.

PAN, M.; TANG, Z.; TU, J.; WANG, Z.; CHEN, Q.; XIAO, R. Materials Science & Engineering C Porous chitosan microspheres containing zinc ion for enhanced thrombosis and hemostasis. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 85, n. October 2017, p. 27–36, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.015>

PASINI CABELLO, S. D.; TAKARA, E. A.; MARCHESE, J.; OCHOA, N. A. Influence of plasticizers in pectin films: Microstructural changes. **Materials Chemistry and Physics**, [s. l.], v. 162, p. 491–497, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.06.019>

PEREIRA, B. M.; BORTOTO, J. B.; FRAGA, G. P. Topical hemostatic agents in surgery: Review and prospects. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 1–11, 2018.

PÉREZ-GÓMEZ, F.; BOVER, R. The New Coagulation Cascade and Its Possible Influence on. **Rev Esp Cardiol**, [s. l.], v. 60, n. 12, p. 1217–1219, 2007.

POHLMAN, T. H.; FECHER, A. M.; ARREOLA-GARCIA, C. Optimizing transfusion strategies in damage control resuscitation: Current insights. **Journal of Blood Medicine**, [s. l.], v. 9, p. 117–133, 2018.

POURSHAHRESTANI, S.; ZEIMARAN, E.; DJORDJEVIC, I.; ADIB, N.; TOWLER, M. R. Inorganic hemostats : The state-of-the-art and recent advances. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 58, p. 1255–1268, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.008>

PUSATERI, A. E.; HOLCOMB, J. B.; KHEIRABADI, B. S.; ALAM, H. B.; WADE, C. E.; RYAN, K. L. Making sense of the preclinical literature on advanced hemostatic products. **Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 674–682, 2006.

RATNER, M. Recombinant thrombin approved. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 26, p. 250, 2008. Disponível em: <https://link.gale.com/apps/doc/A198474223/AONE?u=anon~22f77626&sid=googleScholar&xid=646e5eeb>

RENARD, C. M. G. C.; JARVIS, M. C. A cross-polarization, magic-angle-spinning, 13C-nuclear-magnetic-resonance study of polysaccharides in sugar beet cell walls. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 119, n. 4, p. 1315–1322, 1999.

REZENDE, C. A.; DE LIMA, M.; MAZIERO, P.; DEAZEVEDO, E.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 4, n. November, 2011.

REZVANAIN, M.; AHMAD, N.; MOHD AMIN, M. C. I.; NG, S. F. Optimization, characterization, and in vitro assessment of alginate-pectin ionic cross-linked hydrogel film for wound dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 97, p. 131–140, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.079>

RIDDEL, J. P.; AOUIZERAT, B. E.; MIASKOWSKI, C.; LILLICRAP, D. P. Theories of blood coagulation. **Journal of Pediatric Oncology Nursing**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 123–131, 2007.

ROBERT M. SILVERSTEIN, FRANCIS X. WEBSTER, D. J. K. **Spectrometric identification of organic compounds**. [s.l: s.n.].

ROBERT, S. **SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF ORGANIC COMPOUNDS/ROBERT M. SILVERSTEIN; FRANCIS X. WEBSTER; DAVID J. KIEMLE.** [s.l: s.n.].

ROLIN, C.; DE VRIES, J. **Pectin, Food Gels (P. Harris, ed.)**, Elsevier Applied Science, London-New York, 1990.

RONG, J. jing; LIANG, M.; XUAN, F. qi; SUN, J. yang; ZHAO, L. jun; ZHENG, H.

zhen; TIAN, X. xiang; LIU, D.; ZHANG, Q. yu; PENG, C. fei; LI, F.; WANG, X. zeng; HAN, Y. ling; YU, W. ting. Thrombin-loaded alginate-calcium microspheres: A novel hemostatic embolic material for transcatheter arterial embolization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 104, p. 1302–1312, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.020>

ROUSOU, J. A. Use of fibrin sealants in cardiovascular surgery: A systematic review. **Journal of Cardiac Surgery**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 238–247, 2013.

SAMUDRALA, S. Topical Hemostatic Agents in Surgery: A Surgeon's Perspective. **AORN Journal**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 2–11, 2008.

SANTANA, A. G.; GRACHER, A. H. P.; RÜDIGER, A. L.; ZANCHIN, N. I. T.; CARVALHO, P. C.; CIPRIANI, T. R.; DE ARRUDA CAMPOS BRASIL DE SOUZA, T. Identification of potential targets for an anticoagulant pectin. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 151, p. 243–250, 2017.

SEMBEROVA, J.; DE PAOLI LACERDA, S. H.; SIMAKOVA, O.; HOLADA, K.; GELDERMAN, M. P.; SIMAK, J. Carbon nanotubes activate blood platelets by inducing extracellular Ca 2+ influx sensitive to calcium entry inhibitors. **Nano Letters**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 3312–3317, 2009.

ŠEŠLIJA, S.; NEŠIĆ, A.; RUŽIĆ, J.; KALAGASIDIS KRUŠIĆ, M.; VELIČKOVIĆ, S.; AVOLIO, R.; SANTAGATA, G.; MALINCONICO, M. Edible blend films of pectin and poly(ethylene glycol): Preparation and physico-chemical evaluation. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 77, p. 494–501, 2018.

SHEFA, A. A.; TAZ, M.; LEE, S. Y.; LEE, B. T. Enhancement of hemostatic property of plant derived oxidized nanocellulose-silk fibroin based scaffolds by thrombin loading. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 208, n. February 2018, p. 168–179, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.056>

SIKORSKI, P.; MO, F.; SKJÅK-BRÆK, G.; STOKKE, B. T. Evidence for egg-box-compatible interactions in calcium - Alginate gels from fiber x-ray diffraction. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 2098–2103, 2007.

SMITH, S. A. The cell-based model of coagulation: State-Of-The-Art Review. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, [s. l.], 2009.

SOHN, J. J.; GRUBER, T. M.; ZAHORSKY-REEVES, J. L.; LAWSON, G. W. Comparison of 2-Ethyl-Cyanoacrylate and 2-Butyl-Cyanoacrylate for use on the calvaria of CD1 mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 199–203, 2016.

SPINK, C. H. Differential Scanning Calorimetry. **Methods in Cell Biology**, [s. l.], v. 84, n. 07, p. 115–141, 2008.

SRIAMORNSAK, P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. **Silpakorn University International Journal**, [s. l.], v. 3, n. 1–2, p. 206–228, 2003.

SUBRAMANIAM, T.; FAUZI, M. B.; LOKANATHAN, Y.; LAW, J. X. The role of calcium in wound healing. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 12, 2021.

SUN, L.; LI, B.; SONG, W.; ZHANG, K.; FAN, Y.; HOU, H. Comprehensive assessment of Nile tilapia skin collagen sponges as hemostatic dressings. **Materials**

Science and Engineering C, [s. l.], v. 109, n. 5, p. 110532, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110532>

SUN, X.; TANG, Z.; PAN, M.; WANG, Z.; YANG, H.; LIU, H. Chitosan / kaolin composite porous microspheres with high hemostatic e ffi cacy. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 177, n. September, p. 135–143, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.131>

SUTAR, T.; BANGDE, P.; DANDEKAR, P.; ADIVAREKAR, R. Herbal hemostatic biopolymeric dressings of alginate/pectin coated with Croton oblongifolius extract. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, [s. l.], v. 2, n. December 2020, p. 100025, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2020.100025>

SYNYTSYA, A.; OPÍKOVÁ, J.; BRUS, J. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of pectins: a peak-fitting analysis in the C-6 region. **Czech Journal of Food Sciences**, [s. l.], v. 21, n. No. 1, p. 1–12, 2018.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and Uses of Pectin - A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 47–73, 1997.

THAKUR, M.; AHMED, A. B. A review of Thromboelastography. **International Journal of Perioperative Ultrasound and Applied Technologies**, [s. l.], v. 1, n. April, p. 25–29, 2012.

TIAN, L.; SINGH, A.; SINGH, A. V. Synthesis and characterization of pectin-chitosan conjugate for biomedical application. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 153, p. 533–538, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.313>

TING, S. V; ROUSEFF, R. L. **Citrus fruits and their products: analysis, technology**. [s.l.] : Dekker, 1986.

TOMPECK, A. J.; GAJDHAR, A. U. R.; DOWLING, M.; JOHNSON, S. B.; BARIE, P. S.; WINCHELL, R. J.; KING, D.; SCALEA, T. M.; BRITT, L. D.; NARAYAN, M. A comprehensive review of topical hemostatic agents: The good, the bad, and the novel. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. E1–E21, 2020.

TRAPANI, L. M. Thromboelastography: Current Applications, Future Directions. **Open Journal of Anesthesiology**, [s. l.], v. 03, n. 01, p. 23–27, 2013.

TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, P. K. Preparation and physicochemical evaluation of chitosan / poly (vinyl alcohol)/ pectin ternary film for food-packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 711–716, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.09.029>

UNIVERSIDAD DE VALENCIA, D. de F.-Q. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear. **Fundamentos de Química Orgánica**, [s. l.], p. 193–207, 2011. Disponível em: <https://www.uv.es/jcastell/Espectroscopia.pdf>

VAN BUREN, J. P. Function of pectin in plant tissue structure and firmness. **The chemistry and technology of pectin**, [s. l.], p. 1–22, 1991.

WANG, C.; LUO, W.; LI, P.; LI, S.; YANG, Z.; HU, Z.; LIU, Y.; AO, N. Preparation and evaluation of chitosan/alginate porous microspheres/Bletilla striata polysaccharide composite hemostatic sponges. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 174, p. 432–442,

2017. a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.112>

WANG, C.; LUO, W.; LI, P.; LI, S.; YANG, Z.; HU, Z.; LIU, Y.; AO, N. Preparation and evaluation of chitosan/alginate porous microspheres/Bletilla striata polysaccharide composite hemostatic sponges. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 174, p. 432–442, 2017. b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.112>

WANG, J. H.; TSAI, C. W.; TSAI, N. Y.; CHIANG, C. Y.; LIN, R. S.; PEREIRA, R. F.; LI, Y. C. E. An injectable, dual crosslinkable hybrid pectin methacrylate (PECMA)/gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogel for skin hemostasis applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 185, n. May, p. 441–450, 2021.

WANG, Q.; PAGÁN, J.; SHI, J. Pectin from fruits. **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**, [s. l.], v. 2, p. 263–309, 2016.

WEDMORE, I.; MCMANUS, J. G.; PUSATERI, A. E.; HOLCOMB, J. B. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: Experience in current combat operations. **Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 655–658, 2006.

WILLIAM, G.; STEPHANIE, M.; HERBERT, E. **AU 2001255716 B2 Hemostatic compositions of polyacids and polyalkylene oxides and methods for their use**, WO 01/82937 A1, 2006.

WOLKOW, N.; JAKOBIEC, F. A.; YOON, M. K. Gelatin-Based Hemostatic Agents: Histopathologic Differences. **Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 452–455, 2018.

WRIGHT, J. K.; KALNS, J.; WOLF, E. A.; TRAWEEK, F.; SCHWARZ, S.; LOEFFLER, C. A. K.; SNYDER, W.; YANTIS, L. D.; EGGERS, J. Thermal injury resulting from application of a granular mineral hemostatic agent. **Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 224–230, 2004.

WU, X.; SUN, H.; QIN, Z.; CHE, P.; YI, X.; YU, Q.; ZHANG, H.; SUN, X.; YAO, F.; LI, J. Fully physically crosslinked pectin-based hydrogel with high stretchability and toughness for biomedical application. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 149, p. 707–716, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.297>

ZANELLA, K. **Extração da Pectina da Casca da Laranja-Pera (Citrus sinensis L. Osbeck) com Solução Diluída de Ácido Cítrico**. 2013. Campinas State University, [s. l.], 2013.

ZHANG, Y. Applications of fibrin tissue sealant. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, [s. l.], v. 632, n. 5, 2021.

ZHONG, Y.; HU, H.; MIN, N.; WEI, Y.; LI, X.; LI, X. Application and outlook of topical hemostatic materials: a narrative review. **Annals of Translational Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 577–577, 2021.

ZHU, R. G.; SUN, Y. Di; HOU, Y. T.; FAN, J. G.; CHEN, G.; LI, T. P. Pectin penta-oligogalacturonide reduces cholesterol accumulation by promoting bile acid biosynthesis and excretion in high-cholesterol-fed mice. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 272, p. 153–159, 2017. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2017.05.018>

ANEXO I: DEPÓSITO DA PATENTE DA INVENÇÃO

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

EXAME PRELIMINAR

N.° do Pedido: BR102021002043-1 **N.° de Depósito PCT:**
Data de Depósito: 03/02/2021

O pedido atende formalmente as disposições legais, especialmente quanto ao Art. 19 da LPI e o Instrução Normativa nº 31/2013, estando apto a ser protocolado.

Condições do Pedido	S	N
Requerimento de depósito com os campos obrigatórios preenchidos	X	
Idioma Português	X	
Relatório Descritivo	X	
Reivindicações	X	
PI e C – Apresenta desenhos citados ou não cita nem apresenta desenhos. MU – Apresenta desenhos.	X	
Resumo	X	
Formatado no padrão exigido	X	
Valor correto de Recolhimento	X	

Rio de Janeiro, 17 de abril de 2021.

Ubirajara Almeida Pinto
Mat. Nº 1467419
DIRPA / COSAP/SEFOR

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 002043 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: Brasil

Telefone: 11 56270217

Fax: 11 56270103

E-mail: auin@unesp.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE AGENTES HEMOSTÁTICOS E ANTIHEMORRÁGICOS A BASE DE PECTINAS; AGENTES HEMOSTÁTICOS E ANTIHEMORRÁGICOS A BASE DE PECTINAS E SEU USO

Resumo: O presente pedido de patente de invenção refere-se a uma nova tecnologia que consiste no método de preparação de agentes hemostáticos e anti-hemorrágicos a base de pectinas, assim como o biopolímeros de pectina e seus derivados como agentes hemostáticos para uso em aplicações cirúrgicas e odontológicas. Os novos agentes hemostáticos a base de pectina foram sintetizados, caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas, e sistematicamente modulados para atuarem

com maior eficiência na cascata de coagulação. Os estudos da ação hemostática dos novos agentes derivados de pectina foram feitos in vitro, empregando-se para isso análises tromboelastrográficas, comparadas à ação de agentes hemostáticos comerciais à base de quitosana, celulose e materiais inorgânicos e sua ação foi superior aos dos agentes hemostáticos comerciais. A avaliação de parâmetros tais como: a) o tempo reação para de formação de um coágulo de com tamanho de aproximadamente 2 mm, o que caracteriza o início da produção de fibrina, b) o tempo de formação de um coágulo firme de 20 mm e a taxa de geração de trombina e a conversão de fibrinogênio em fibrina, c) propriedade elástica da fibrina formada e adesão plaquetária.

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Renan Padron Almeida

Número OAB:

Numero API:

CPF/CNPJ: 33778301896

Endereço: Rua Joaquim Antunes 819

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05415012

Telefone: 1156270570

Fax:

Email: renan.padron@unesp.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 3

Nome: JOSE GERALDO NERY

CPF: XXXXXXXXX

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua do café,154, apto 31

Cidade: São José do Rio Preto

Estado: SP

CEP: 15060-310

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 3

Nome: OSCAR ANTONIO NIÑO SANTISTEBAN

CPF: XXXXXXXX

Nacionalidade: Colombiana

Qualificação Física: Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins

Endereço: Rua Ramiz Gattaz 317

Cidade: São José do Rio Preto

Estado: SP

CEP: 15054-110

País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email:

:

Inventor 3 de 3

Nome: GUILHERME MOLINARI SACCO

CPF: XXXXXXXXXX

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Prof. Eunice Alcala, 355, apto 31 bloco 5

Cidade: São José do Rio Preto

Estado: SP

CEP: 15054-502

País: BRASIL

Telefone:

Fax: Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Procuração	2. Procuração agente INPI patentes e outros v01-Manifesto.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	comprov PI 25.pdf
Relatório Descritivo	Relatório.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Desenho	Figuras.pdf
Resumo	Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

☑ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

☑ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

PROCURAÇÃO

Pelo presente instrumento, a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei n° 952 de 30.01.1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01.049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente UNESP, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. **PASQUAL BARRETTI**, de acordo com o Art. 34, I de seu
Estatuto, ou quem legalmente o substitua, nomeia e constitui seus procuradores, **SAULO PHILIPE SEBASTIÃO GUERRA**, brasileiro, portador do documento de identidade RG nº 28.679.995-9 - SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 216.002.13855, e **RENAN PADRON ALMEIDA**, brasileiro, portador do documento de identidade RG nº 43.746.608-5 - SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 337.783.018-96, outorgando-lhes poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Intelectual – INPI e outras instituições competentes para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual tais como patentes de invenção e modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas e de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor e de programas de computador, e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópias, termos de cessão de direitos e documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade intelectual, incluindo, mas não se limitando aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como aqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, marcas e desenhos industriais, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso de invenções patenteadas ou marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferência de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença

Este documento foi assinado digitalmente por Pasqual Barretti.
Para verificar as assinaturas vá ao site https://portal.assinasp.imprensaoficial.com.br/Verificar/ e utilize o código EDB2-6B02-41FC-753A.

compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e de licenciamento exclusivo ou não exclusivo, e praticar para o fim mencionado todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante, cessando os efeitos deste a partir de 15 de janeiro de 2025.

Ciente que a falsidade dessa declaração configura crime previsto no Código Penal Brasileiro e é passível de apuração na forma da Lei, bem como das responsabilidades pela declaração apresentada, firmo a presente.

----------(assinado digitalmente)----------

Agência UNESP de Inovação
Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro
CEP. 01049-010, São Paulo/SP - Brasil
Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br

Este documento foi assinado digitalmente por Pasqual Barretti.
Para verificar as assinaturas vá ao site https://portal.assinasp.imprensaoficial.com.br/Verificar/ e utilize o código EDB2-6B02-41FC-753A.