



29

**Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Centro de Ciências Físicas e Matemáticas**  
**Departamento de Química**  
**QUITECH – Grupo de Pesquisa em Quitinas e**  
**Aplicações Tecnológicas**



03753112

**“SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HEPARINA**  
**DE BAIXA MASSA MOLAR”**

**Orientador: Prof. Dr. Mauro C. M. Laranjeira**  
**Acadêmica: Thalia Camila Coelho**

Florianópolis, fevereiro de 2004.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que esteve junto comigo nos momentos mais difíceis deste percurso.

Aos meus pais Ivo e Tânia e ao meu irmão e irmãs, que sempre me apoiaram e me auxiliaram em todos os momentos de minha vida, especialmente durante o período de desenvolvimento do meu curso.

Ao Carlos Eduardo, pelo amor, incentivo e paciência durante estes anos.

Ao professor Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira, pela amizade, dedicação, e orientação no trabalho.

Aos professores Dr. Valfredo Tadeu de Fávere, Dr. Marina Uieara e Dr. Faruk Jose Nome Aguilera pela amizade, colaboração, sugestões, críticas favoráveis e construtivas.

Aos colegas de laboratório, pela amizade e colaboração nos trabalhos executados.

Aos funcionários da Central de Análises, departamento de química e biblioteca, pelos serviços prestados.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou a execução deste trabalho.

Enfim, a todos que direta e indiretamente colaboraram na execução deste trabalho, o meu muito obrigado.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Unidade repetida do dissacarídeo de heparina	06
Figura 2	Estrutura da heparina na forma sódica	15
Figura 3	Complexo: Heparina e sal de amônio quaternário	16
Figura 4	Heparina Esterificada	17
Figura 5	Estrutura da heparina com $\beta$ -eliminação no carbono 4 e 5	19
Figura 6	Infravermelho da Heparina Comercial	21
Figura 7	Infravermelho da Heparina Esterificada	21
Figura 8	Infravermelho da Heparina Despolimerizada	22
Figura 9	Titulação condutimétrica da heparina	24
Figura 10	Titulação condutimétrica da heparina esterificada	25
Figura 11	Cromatograma da Heparina Pura	27
Figura 12	Cromatograma da Heparina Despolimerizada	27
Figura 13	Tempo de Tromboplastina Parcial	29

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Concentração de Heparina Comercial	14
Tabela 2	Análise elementar	22
Tabela 3	HPLC	26
Tabela 4	Tempo de Tromboplastina Parcial	29

## RESUMO

Este trabalho teve como proposta a síntese e caracterização de heparina de baixa massa molar para ser utilizada na liberação controlada de heparinóide a partir de matrizes de quitosana, visando estabelecer novas vias de formulação de medicamentos por via oral em uso na profilaxia e no tratamento de eventos de trombooses agudas. A heparina, um polissacarídeo extraído de fontes naturais, apresenta importantes propriedades farmacológicas como anticoagulante no tratamento de enfarto do miocárdio e antitrombose no tratamento de trombooses venosas pós-operatórias. Entretanto, uma grande desvantagem da heparina é que ela só pode ser administrada por via injetável, pois é desativada oralmente. A fragmentação das heparinas em moléculas de baixa massa molar média na faixa de 2000 a 10000 daltons é uma alternativa para preparar heparinas que tenham atividade antitrombose elevada, boa atividade anticoagulante e baixa toxicidade. As etapas do processo de síntese de heparina de baixa massa molar envolveram a purificação da heparina comercial, a preparação do sal de amônio quaternário de heparina, a esterificação do sal de heparina e despolimerização do éster de heparina. A caracterização dos heparinóides sintetizados foi realizada por espectroscopia no infravermelho e análise elementar. Os graus de substituição da heparina e heparinóides foram determinados por titulação condutimétrica. A determinação de massa molar foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência e a atividade anticoagulante por tempo de tromboplastina parcial.

10416

O termo "polímero" vem do grego ("muitas partes") e é indefinido, no sentido de que o menor comprimento ou tamanho de molécula não é especificado. Literalmente, qualquer molécula com algumas "partes", isto é, meros, pode ser chamada de polímero. Entretanto, essa expressão é geralmente aceita como significando uma molécula muito maior, de tamanho tal que as propriedades associadas às moléculas de cadeia longa tenham-se tornado evidentes. Frequentemente se encontra a expressão *alto polímero* para chamar a atenção para o fato de que o polímero considerado tem, realmente, uma elevada massa molar. Os polímeros de baixa massa molar são chamados oligômeros (também do grego, "poucas partes").

10417

Monômeros são compostos químicos que reagem para formar polímeros. Em alguns casos, tem praticamente a mesma composição centesimal que os polímeros; em outros, a composição centesimal é diferente.

10418

As propriedades especiais de moléculas muito grandes não começam a surgir a uma massa molar definida. No entanto, em geral, a partir de 1000-1500, essas propriedades começam a aparecer e se tornam evidentes à medida que esse número aumenta. Alguns polímeros têm massas molares até mesmo na ordem de milhões, porém a maioria dos polímeros que tem propriedades físicas úteis, do ponto de vista técnico, tem massas molares da ordem de dezenas ou centenas de milhar.

Em contraste com as substâncias químicas comuns, os polímeros não são produtos homogêneos; contém mistura de moléculas, de massas molares, apresentando o que se chama de *polimolecularidade*. Devido à sua grande massa, não ocorrem, em geral, modificações fundamentais pela entrada ou retirada de alguns átomos ou grupos de átomos, ao contrário do que se observa nos compostos químicos usuais. O conceito de *polímero puro* é bem diferente do que se aplica à Química, em geral, já que não se obtém, nem interessa obter, frações com absoluta uniformidade molecular, para qualquer finalidade de aplicação industrial.

Como os polímeros não são substâncias "puras", no sentido usual do termo em Química Orgânica, porém misturas de moléculas de diferentes massas molares e mesmo diferentes estruturas, embora possam ter praticamente a mesma composição centesimal, é importante conhecer a curva de distribuição dessas massas e a massa molar média do produto. (MANO, 1985; BLASS, 1988)

A caracterização estrutural do produto polimérico é feita pelos métodos usuais em Química Orgânica: massa molar, análise elementar, análise espectrométrica, análise difratométrica, etc.

A avaliação tecnológica dos polímeros é feita através de suas propriedades físicas, como produto "puro" e como composto moldado, conforme as propriedades investigadas e a natureza do polímero. (MANO, 1985)

No sentido químico clássico, o termo degradação significa destruição da estrutura. Em uma de suas acepções relativas aos polímeros, se considera como qualquer processo que leve a deteriorização de suas propriedades e, portanto a redução da massa molar.

Há dois tipos gerais de processos de degradação dos polímeros, um dos quais, a ruptura ou cisão se produz em pontos ao longo da cadeia, deixando fragmentos que são usualmente grandes quando comparados com a unidade do monômero. Outra maneira seria através de um processo de despolimerização em cadeia, implicando na liberação sucessiva de unidades do monômero a partir de um extremo da cadeia.

As degradações de polímeros podem ser produzidas por muitos fatores: temperatura, água, oxigênio, radiação, organismos biológicos. Tanto as cadeias principais, como as laterais, podem ser afetadas pelo processo de degradação, e conseqüentemente, perdas irreversíveis nas propriedades físicas do material podem ocorrer.

Recentemente muita atenção tem sido dada aos polissacarídeos como materiais poliméricos. Um grande número de estudos das propriedades, no estado sólido, desses polímeros renováveis tem aparecido na literatura e se tornando relevantes.

## 1.2. Glicosaminoglicanos

Os heteropolissacarídeos, chamados glicosaminoglicanos, são uma família de polímeros lineares compostos por unidades repetidas de dissacarídeos. Um dos monossacarídeos que compõem os dissacarídeos é sempre a *N*-acetilglucosamina ou a *N*-acetilgalactosamina, o outro na maioria dos casos é um ácido urônico, usualmente o ácido D-glucurônico ou o ácido L-idurônico. Em alguns glicosaminoglicanos, uma ou mais das hidroxilas do açúcar aminado estão esterificadas com sulfato. A combinação desses grupos sulfato e dos grupos carboxilato das unidades de ácido urônico dá aos glicosaminoglicanos uma alta densidade de cargas negativas. Para minimizar as forças repulsivas entre os grupos carregados vizinhos, essas moléculas assumem uma conformação estendida quando em solução. (VOET, 2000; NELSON, 2002)

Há cinco tipos de glicosaminoglicanos: Hialuronato, Sulfato de condroitina, Heparina, Sulfato de queratana e Sulfato de dermatana.

O sulfato de dermatana difere do sulfato de condroitina por seu ácido urônico predominante ser ácido L-idurônico, embora ácido D-glucurônico também esteja presente, em quantidades variáveis. As ligações glicosídicas têm as mesmas posições e configurações do sulfato de condroitina, com cadeias polissacarídicas médias com massas molares de  $2-5 \cdot 10^4$ . Ao contrário do sulfato de condroitina, o sulfato de dermatana é antitrombótico, como a heparina, mas ao contrário da heparina, apresenta mínimas atividades anticoagulante e antilipêmica no sangue. Como macromolécula de tecido conjuntivo, sulfato de dermatana é encontrado na pele, nos vasos sanguíneos e nas válvulas cardíacas.



### 1.3. Heparina

A heparina é um agente biologicamente ativo da família glicosaminoglicana. A heparina difere dos demais glicosaminoglicanos em vários aspectos importantes. Glucosamina e ácido D-glucurônico ou ácido L-idurônico formam a unidade dissacarídica repetida característica, unidas por ligação 1→4. Em contraste com a maioria dos outros glicosaminoglicanos, a heparina contém ligações  $\alpha$ -glicosídicas. Quase todos os resíduos de glucosamina contêm ligações sulfamida, mas um pequeno número de resíduos de glucosamina são *N*-acetilados. O conteúdo em sulfato da heparina, embora variável, é próximo de 2,5 resíduos por unidade dissacarídica, em preparações de maior atividade biológica, mostrado na Figura 1. (DEVLIN, 2002)

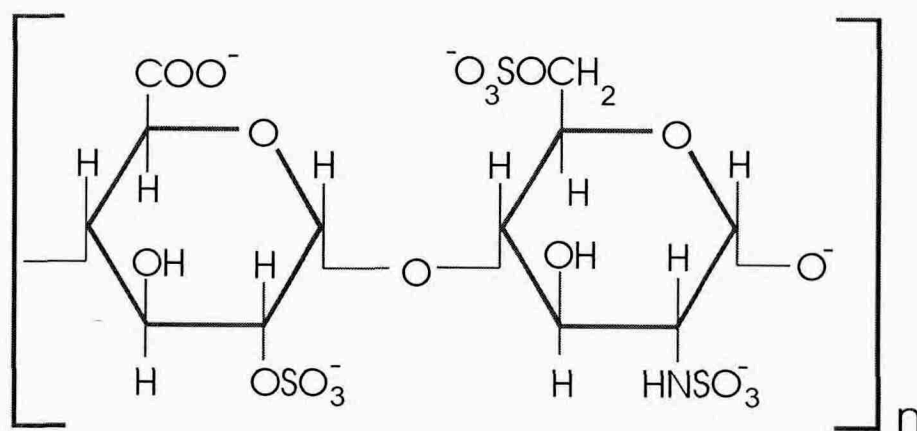


Figura 1 - Unidade repetida do dissacarídeo de heparina.

Desde a sua descoberta em 1916 por Mc Lean, muitos estudos tem sido feitos com relação à sua estrutura química e sua farmacologia. Com relação aos aspectos físico-químicos da heparina, ela comporta-se como polieletrólito em soluções aquosas devido a sua densidade de carga altamente negativa. As massas molares da heparina variam de 6.000 a 20.000 daltons.(ERLICH, 1973; JOHNSON et al.,1976)

A elucidação da estrutura química da heparina tem sido relacionada com o tipo de ligação glicosídica, o conteúdo de enxofre e grupo sulfamínos, grupos carboxílicos e outros grupos, e a quantidade de ramificações.

Extraída de fontes naturais, a heparina origina-se nas células mastócitos dos tecidos conectivos, sendo encontrada principalmente nas mucosas intestinais suína, ovina e bovina e no pulmão bovino. (ERLICH e STIVALA, 1973; DEBRIE, 1995)

As suas principais propriedades farmacológicas são suas atividades anticoagulante no tratamento de enfarto do miocárdio e antitrombose no tratamento de trombozes venosas pós-operatórias. Tanto *in vivo* como *in vitro*, a heparina impede a ativação dos fatores da coagulação, mas ela não age diretamente sobre os fatores.

Em vez disso, a atividade anticoagulante da heparina é exercida através da interação da heparina com um inibidor do processo de coagulação. Presumivelmente, a ligação da heparina induz uma alteração conformacional no inibidor, que era uma interação complementar entre o inibidor e o fator da coagulação ativado, impedindo que o fator participe do processo de coagulação. O inibidor que interage com a heparina é a antitrombina III, um inibidor protéico plasmático de serino-proteases. Na ausência de heparina, a antitrombina combina-se lentamente com vários fatores ativos da coagulação (10-30 min), formando complexos desprovidos de atividade proteolítica. Em presença de heparina, complexos inativos se formam em poucos segundos. A antitrombina III contém um resíduo de arginina, que se combina com a serina do sítio ativo dos fatores Xa e IXa. (ROSEMBERG, 1984)

Além das propriedades antilipêmica, antiaterosclerose e antiinflamatória, a heparina também é um potente anti-metastático (combate à migração de células cancerosas para outros órgãos).

Entretanto, em seu estado natural, as heparinas apresentam inúmeras desvantagens as quais limitam a extensão do seu uso de maneira efetiva. Certamente, as fortes atividades anticoagulante das heparinas trazem preocupações, no sentido, que as mesmas podem levar a quadros hemorrágicos, além disso, as suas sensibilidades a determinados fatores séricos, impossibilitam a administração de doses relativamente significativas ao paciente.

Desta forma, torna-se necessário favorecer a atividade antitrombótica destes compostos, atribuída a atividade anti-pró-trombinase, desfavorecendo a atividade anticoagulante, atribuída ao efeito anti-trombina. A atividade anticoagulante marcante das heparinas que pode causar hemorragia. Apesar disto, é necessário favorecer a atividade antitrombose às custas da atividade anticoagulante. (DEBRIE, 1995; SALIH et al, 1997)

O conteúdo de enxofre da heparina tem sido mostrado estar associado à sua atividade anticoagulante. (ERLICH, 1973)

#### **1.4. Heparinóides**

Heparinóides são substâncias que tem ação biológica similar a heparina. Alguns exemplos são ésteres sulfatados de quitina, amido, celulose, sulfato de dextrana, ácido alginico sulfatado, quitosana modificada por sulfatação e oxidação entre outras.(ERLICH, 1973; LANE et al., 1978; PAVÃO et al., 1995)

Entretanto, a maioria destes heparinóides apresenta atividade anticoagulante baixa e/ou toxicidade elevada. A busca de modificações químicas na heparina para obter um heparinóide de baixa massa molar com boa atividade anticoagulante e baixa toxicidade tem sido a preocupação de muitos pesquisadores. Uma das grandes desvantagens da heparina é que ela só pode ser administrada por via injetável, pois é desativada oralmente. (LANE et al., 1978; PAVÃO et al., 1995)

A heparina de baixa massa molar foi preparada pela primeira vez no mundo, em 1974, pela equipe dos bioquímicos Carl Peter von Dietrich e Helena Nader, da Unifesp. Quando eles quebravam a heparina normal, descobriram que sobrava uma substância menor, com cerca de um terço do tamanho da heparina, que perdia a atividade anticoagulante, mas mantinha a ação antitrombótica.

O produto industrializado entrou no mercado apenas cerca de um quarto de século mais tarde. Começou a ser usada na Europa, em 1990, e nos EUA, em 1995. No Brasil, ela é usada há oito anos.

A heparina de baixa massa molar é obtida através da despolimerização da heparina com a produção de fragmentos com massa molar entre 2.000 e 10.000 daltons. É uma alternativa para preparar heparinas que tenham atividade antitrombose elevada e atividade anticoagulante menor do que as heparinas de alta massa molar, possuindo as propriedades farmacológicas necessárias para aplicações terapêuticas melhoradas (DEBRIE, 1995). A heparina de baixa massa molar possui menor afinidade por proteínas plasmáticas, vasculares, células endoteliais, macrófagos e plaquetas. Conseqüentemente, possui maior biodisponibilidade (recuperação plasmática), maior meia-vida plasmática, resposta mais previsível a doses fixas e redução dos efeitos colaterais.

A heparina de baixa massa molar é mais eficiente porque permanece mais tempo ativa na circulação. Por esse motivo, ela pode ser usada em doses menores. Uma dose diária de heparina de baixa massa molar tem ação equivalente a três doses de heparina normal.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O presente trabalho propõe a síntese de heparina de baixa massa molar para ser aplicada no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de heparinóide, a partir de matrizes de quitosana, visando estabelecer novas vias de formulação de medicamentos em uso na profilaxia e no tratamento de eventos de trombooses agudas, atuando principalmente no aumento da eficácia terapêutica, na redução do número de doses e na toxicidade deste medicamento.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Purificar as amostras de heparina para eliminação sulfato de dermatana.
- Sintetizar heparinóides a partir das heparinas comerciais.
- Caracterizar os heparinóides sintetizados como produto acabado por espectroscopia no infravermelho e análise elementar.
- Determinar a razão dos teores de grupos sulfatos e carboxílicos e o grau de substituição da heparina e heparinóides por titulação condutimétrica.
- Determinar a massa molar da heparina e heparinóides por cromatografia líquida de alta eficiência.
- Determinar a atividade anticoagulante da heparina e heparinóides através de testes de tempo de tromboplastina parcial.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Equipamentos**

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica marca Shangping Eletronic Balance, modelo FAI 6045. As medidas de pH foram feitas com pH-metro marca Corning, modelo pH / ion analyser 350.

Para os estudos da esterificação utilizou-se o banho termostatizado Shaker Bath da marca Lab Line.

A titulação condutimétrica foi realizada utilizando-se um titulador automático da marca Schott Gerate, modelo T80 / 20 e um condutivimetro da marca Mettler Toledo, modelo MC 226.

As análises de Infravermelho foram realizadas em pastilhas de KBr, utilizando-se um aparelho de Infravermelho Perkin Elmer FTIR 16 PC.

As análises para carbono, hidrogênio e nitrogênio foram efetuadas em um analisador elementares CE Instruments – CHNS EA 1100.

As massas molares foram determinadas por HPLC, utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu, equipado com um detector SPD-10A UV-VIS e com uma coluna Diol-150 da Shimadzu.

Para os estudos da atividade anticoagulante foi utilizado a centrífuga FANEM, modelo 208-N.

#### **3.2. Reagentes**

As heparinas sódicas foram cedidas gentilmente pelas empresas: Bioibérica S.A. ( Barcelona, Espanha) e Kin Master (Passo Fundo, RS). E os demais reagentes analíticos utilizados foram de grau Pró-análise (P.A).

### **3.3. Métodos**

#### **3.3.1. Remoção de Sulfato de Dermatana**

Metanol (180 mL) foi adicionado a heparina comercial na forma sódica (10 g) dissolvida em 100 mL de água contendo 3 g de NaCl. Após a precipitação o produto foi filtrado, lavado com metanol e seco em dessecador.

#### **3.3.2. Preparação do Sal de Amônio Quaternário de Heparina**

Uma solução de cloreto de benzalcônio (25 g) em água (125 mL) foi adicionada a uma solução de heparinato de sódio purificada (10 g) dissolvida em água (100 mL). O produto obtido em temperatura ambiente foi filtrado, lavado com água e após seco em dessecador.

#### **3.3.3. Esterificação**

Cloreto de 4-cloro benzila (15 mL) foi adicionado a uma solução de heparinato de benzalcônio (15 g) dissolvido em clorofórmio (75 mL). A solução foi aquecida a temperatura de 35 °C durante 25 horas. Uma solução de acetato de sódio a 10 % (m/v) em metanol foi adicionada a mistura reacional. O produto foi filtrado, lavado em metanol e seco em dessecador.

#### **3.3.4. Determinação do Grau de Esterificação**

O grau de esterificação do éster benzílico de heparina foi determinado por titulação condutimétrica através da medida dos grupos sulfato e carboxílico. A heparina sódica foi inicialmente convertida na forma ácida por eluição de uma quantidade conhecida de heparina, dissolvida em água neutra deionizada, através de uma coluna previamente empacotada com resina Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>), a qual ocupou 7 cm<sup>3</sup>, foram coletados 150 mL de eluente. A solução foi titulada com a solução de NaOH 0,1 M adicionada. Repete-se o procedimento para a heparina esterificada. (EBERT, 1982)

### **3.3.5. Despolimerização do Éster de Heparina**

O éster benzílico de heparina obtido na forma de sal (1 g) foi dissolvido em água (20 mL). Esta solução foi aquecida a 58 °C e adicionado 0,11 g de NaOH. A temperatura foi mantida por 1 hora e a mistura reacional foi esfriada para cerca de 20 °C e neutralizada por adição de ácido clorídrico diluído. A concentração do meio foi então ajustada para 10% (m/v) de cloreto de sódio e o produto foi precipitado em etanol (60 mL) e filtrado, lavado com etanol e seco em dessecador.

### **3.3.6. Determinação da Massa Molar**

A massa molar da heparina e heparina despolimerizada foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) pelo método da exclusão. Utilizou-se uma coluna Shimadzu – Diol 150 e como solvente um tampão Tris de pH=9, com uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min e monitorado com um detector UV-VIS a 210 nm. O sistema foi calibrado com uma proteína padrão do tipo MW-GF-200 kit; Sigma.

### **3.3.7. Determinação da Atividade Anticoagulante**

Foram misturadas 9 partes de sangue recentemente colhido com 1 parte de citrato de sódio a 0,11 mol/L. A mistura foi centrifugada imediatamente por 5 minutos a 1500-2000g (aproximadamente 3000 rpm) e o plasma separado foi transferido para tubo-teste limpo. O plasma foi testado até 3 horas após a coleta. Para dosagem de heparina, foi utilizado plasma pobre em plaquetas (alta centrifugação). O sangue foi colhido em tubos de plástico.



As amostras de plasmas frescos normais (PFN) foram preparadas a partir de, no mínimo, 5 doadores. Diluir 200µg de heparina com 10 mL de salina isotônica 0,85% para 10 U/mL. Misturar 0,2 mL de heparina diluída com 1,8 mL do PFN = heparina padrão (1U/mL). Diluir a heparina padrão 1U/mL com PFN da seguinte forma:

Tabela 1: Concentração de Heparina Comercial.

Tubos Teste	1	2	3	4	5
Heparina Comercial 1 U/mL	0,5mL	0,4mL	0,3mL	0,2mL	0,1mL
PFN	-	0,1mL	0,2mL	0,3mL	0,4mL
Concentração de Heparina	1U	0,8U	0,6U	0,4U	0,2U

Um volume de 0,1 mL de cada diluição de heparina foi pipetado em tubos-teste limpos. 0,1 mL de DiaCelin (nome comercial, que é a cefalina de cérebro de coelho com complexo de caolim, líquida, pronta para uso), pré-aquecido a 37°C, foi pipetado, misturado e incubado exatamente a 3 minutos a 37°C. Um volume de 0,1 mL de cloreto de cálcio, pré-aquecido a 37°C, foi adicionado a mistura anterior, e simultaneamente o cronômetro foi disparado. O cronômetro foi travado ao se observar o primeiro sinal de fibrina (formação do coágulo).

O procedimento para a determinação da atividade anticoagulante da heparina despolimerizada foi o mesmo da heparina comercial.

## 4. RESULTADOS FINAIS

### 4.1. Síntese

As propriedades da heparina possivelmente podem ser otimizadas através da redução do índice de impurezas, isto porque a grande maioria das heparinas contém contaminantes tais como ácidos nucleicos e polipeptídeos ou até mesmo diversos polissacarídeos. Dentre os últimos os sulfatos de condroitinas e sulfatos de dermatanas são especialmente representativos. Estes contaminantes, em consequência de elevadas massas molares, da presença de substituintes e do grau de sulfatação, são capazes de interferir na preparação do produto (por exemplo, na seqüência da despolimerização) afetando a distribuição final da massa molar ou mesmo interferir na atividade biológica, através da modificação das respectivas proporções das cadeias poliméricas ativas.

Neste experimento, torna-se possível não somente a remoção de tais impurezas, mas também aumenta consideravelmente as propriedades aferidas.

Como pré-tratamento foi adicionado cloreto de sódio (NaCl) na solução de heparina para manter a forma sódica (Figura 2). O material inicial (heparina) é precipitado preliminarmente com álcool, antes da salificação. Um álcool representativo que fornece bons resultados é o metanol.

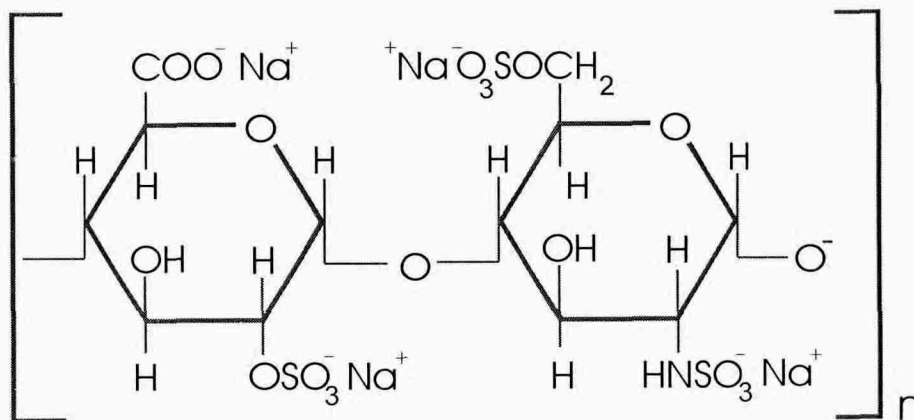


Figura 2 – Estrutura da heparina na forma sódica.

O processo de preparo compreende:

- primeiramente a salificação da heparina em meio aquoso através de um sal de amônio quaternário de cadeia longa,
- em seguida a esterificação do sal,
- então, temos a despolimerização.

A heparina sódica foi preparada através da interação entre um sal estequiometricamente em excesso com o sódio da heparina, em meio aquoso, a uma temperatura na região de 20°C. O sal de amônio quaternário utilizado foi o cloreto de benzalcônio, o qual reage facilmente com o sódio da heparina. Torna-se necessária à realização desta etapa, uma vez que a heparina é solúvel em solventes aquosos e a etapa seguinte, de esterificação, ocorre em meio orgânico. A adição do cloreto de benzalcônio é para que torne a heparina solúvel em solventes orgânicos, pois este possui um grupo R de cadeia longa, o que faz com que diminua a solubilidade da heparina em meio aquoso.

Há formação de um complexo entre a heparina polianiônica com o amônio quaternário catiônico, mostrado na Figura 3.

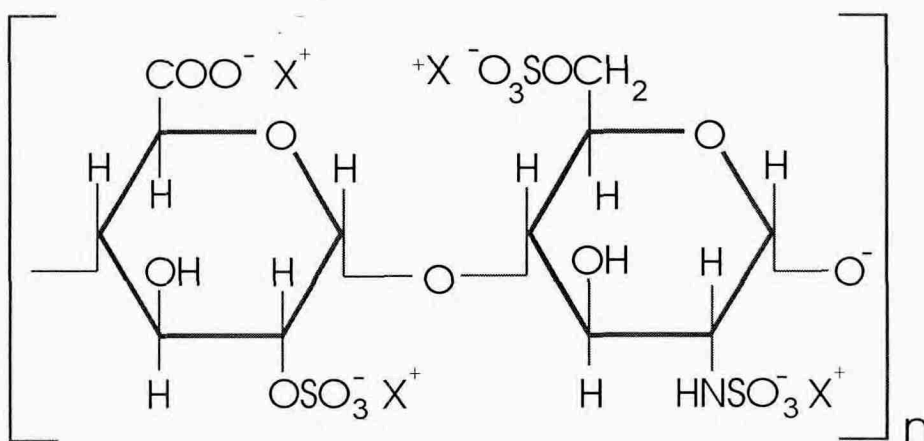
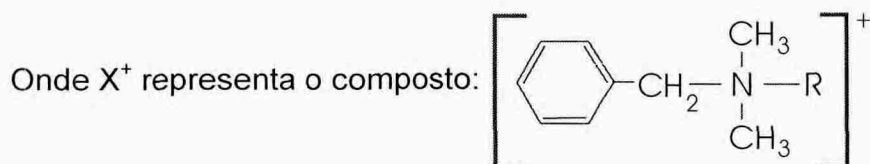


Figura 3 – Complexo: Heparina e sal de amônio quaternário.



Em uma segunda etapa a esterificação foi realizada sob as seguintes condições: o éster parcial da heparina (éster aromático), na forma de sal, pode ser preparado pela esterificação do sal de amônio quaternário de cadeia longa da heparina em um solvente orgânico clorado (clorofórmio), na presença de um derivado clorado (cloreto de 4-cloro benzila), na relação 1:5:1 (Figura 4). Embora a heparina seja insolúvel em solventes orgânicos, o complexo com cátion de amônio quaternário é solúvel em solvente orgânico. A eficiência da reação pode ser aumentada através do rígido controle das proporções dos reagentes, da temperatura e do tempo reacional. A temperatura reacional do meio foi realizada a um valor que variou de 35 - 55°C, ocorrendo preferencialmente em 35°C, o tempo reacional variou de 25 horas a 37 horas, ocorrendo preferencialmente em 25 horas.

O éster parcial da heparina está na forma de sal, desta forma, pode ser recuperado através da precipitação com álcool (metanol), na presença de acetato de sódio.

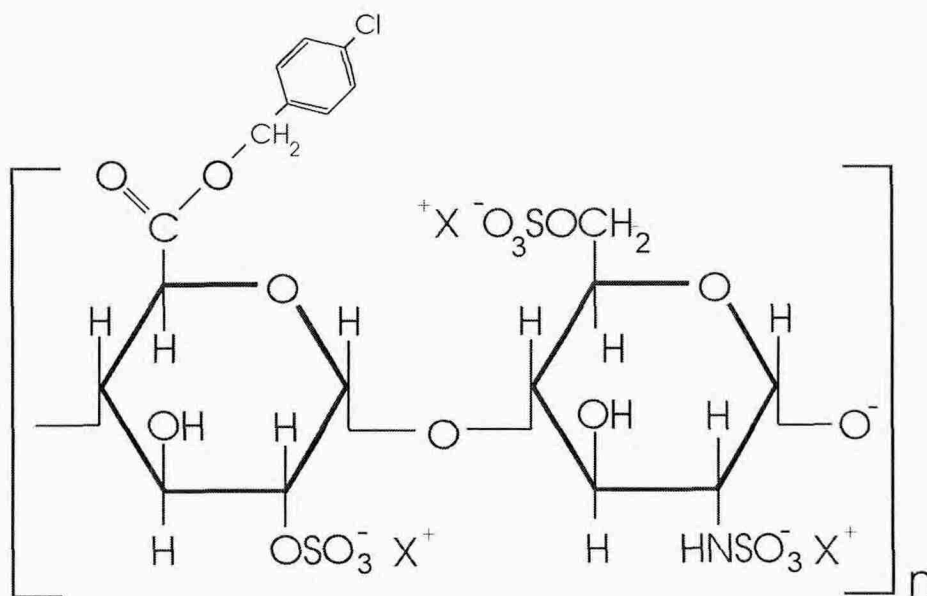
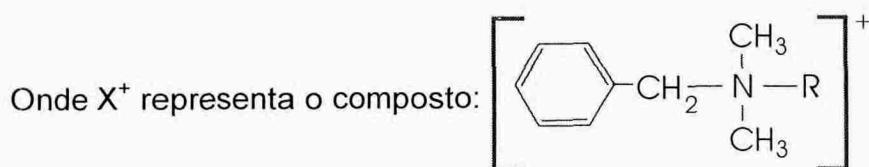


Figura 4 – Heparina Esterificada.



A esterificação ocorre unicamente no íon carboxilato do ácido D-glucurônico, por ser um nucleófilo forte, que reage rapidamente com um dado substrato. Já o íon sulfônico é um nucleófilo fraco, que reage lentamente com o mesmo substrato, sob as mesmas condições de reação, o que justifica a não esterificação do mesmo.

É freqüentemente necessária a modificação de grupos funcionais para evitar a interferência com alguma reação na seqüência sintética. Um caminho para isto são os grupos protetores. Para tanto foi realizada a esterificação, no intuito de proteger o íon carboxilato.

Grupos protetores exercem função passiva na síntese. Cada operação de introdução e remoção de grupos protetores acrescentam etapas na seqüência sintética. Desta forma é desejável minimizar o número de operações semelhantes.

Não existe um grupo protetor universal, logo, cada grupo funcional tem preferência por um grupo protetor.

Na etapa final ocorre o processo de despolimerização, onde temos o éster da etapa anterior sendo tratado com uma base forte (hidróxido de sódio) em uma solução aquosa para a obtenção da heparina de baixa massa molar. Foi feita uma hidrólise básica para que a base retirasse o próton da heparina e ocorresse uma  $\beta$ -eliminação, pois também sairia a ligação glicosídica. É formada, então, uma insaturação no grupo terminal entre o C<sub>4</sub> e o C<sub>5</sub> do ácido D-glucurônico, que é mostrada na figura 5.

Quando dois grupos de átomos vizinhos são perdidos e formam uma dupla ou tripla ligação, a reação é chamada de  $\beta$ -eliminação.

A  $\beta$ -eliminação é feita neste anel, pois o hidrogênio do C<sub>5</sub> é bem ácido, uma vez que está ao lado de uma carbonila (C<sub>6</sub>), e a base vai preferir este hidrogênio.

As ligações glicosídicas são facilmente hidrolisadas por ácido, mas resistem à clivagem por base.

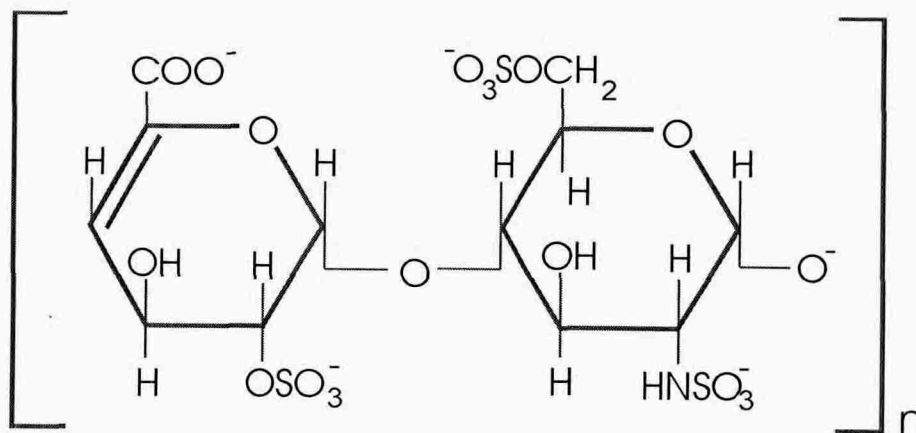


Figura 5 – Estrutura da heparina com  $\beta$ -eliminação no carbono 4 e 5.

O produto pode então ser recuperado pela neutralização do meio reacional com um ácido inorgânico diluído (ácido clorídrico), sendo adicionado cloreto de sódio para deixar na forma de sal e precipitou na presença de um álcool (etanol).

O rendimento deste experimento é baixo, considerando que em todas as etapas houve precipitação em meio aquoso ou orgânico. O rendimento obtido foi de 13,7 %.

## 4.2. Caracterização da Heparina

As amostras de heparina foram caracterizadas por: espectroscopia de infravermelho, análise elementar, titulação condutimétrica, cromatografia líquida de alta eficiência e atividade anticoagulante.

### 4.2.1. Análise do Espectro de Infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho contêm tantos picos que a possibilidade de que dois compostos diferentes apresentem o mesmo espectro no infravermelho é extremamente pequena. Neste sentido, o espectro no infravermelho tem sido comparado a uma “impressão digital” de uma molécula. Deste modo se duas amostras puras têm diferentes espectros no infravermelho, pode-se ter a certeza de que elas representam diferentes compostos. Os espectros no infravermelho fornecem uma grande riqueza de informações sobre as estruturas dos compostos.

Com a análise do espectro de infravermelho da heparina (Figura 6) consegue-se observar a presença dos picos referentes aos grupos funcionais existentes na cadeia polimérica, tais como, OH, CH, NH e C=O. Observa-se para a heparina comercial as principais bandas: 3458  $\text{cm}^{-1}$  banda de estiramento da ligação O-H do COOH; e 2924  $\text{cm}^{-1}$  banda de estiramento C-H; 1630  $\text{cm}^{-1}$  banda característica da ligação C=O; e 1424  $\text{cm}^{-1}$  deformação axial do grupo C-O; 1236  $\text{cm}^{-1}$  deformação axial assimétrica do grupo C-O-C; 1028  $\text{cm}^{-1}$  deformação axial simétrica do grupo C-O-C; 892 , 798 e 584  $\text{cm}^{-1}$  do grupo N-H fora do plano. Através da análise de infravermelho comprova-se a presença de todos os grupos funcionais da heparina mostrando que a análise de infravermelho é útil para a caracterização do polímero.

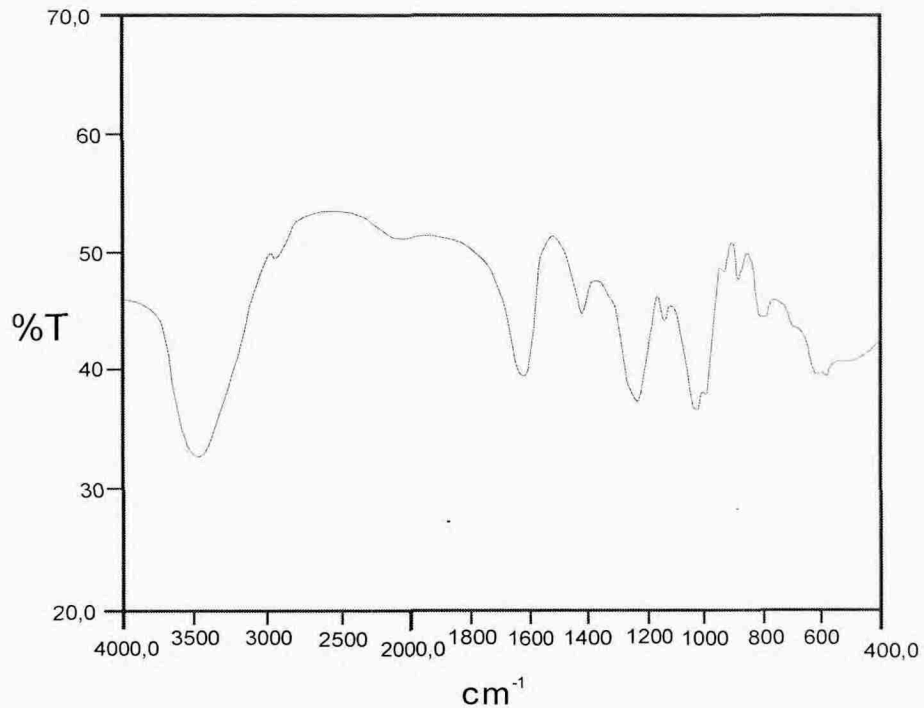


Figura 6 - Infravermelho da Heparina Comercial.

A esterificação foi confirmada através da espectroscopia no infravermelho (Figura 7) com a banda de  $2924\text{ cm}^{-1}$  banda de estiramento C-H; a banda de  $1740\text{ cm}^{-1}$  característica da ligação C=O do éster aparece somente neste infravermelho;  $1636\text{ cm}^{-1}$  banda da ligação C=O. Tanto a banda de  $2924\text{ cm}^{-1}$  quanto a de  $1636\text{ cm}^{-1}$  apresentaram picos mais intensos que na heparina comercial.

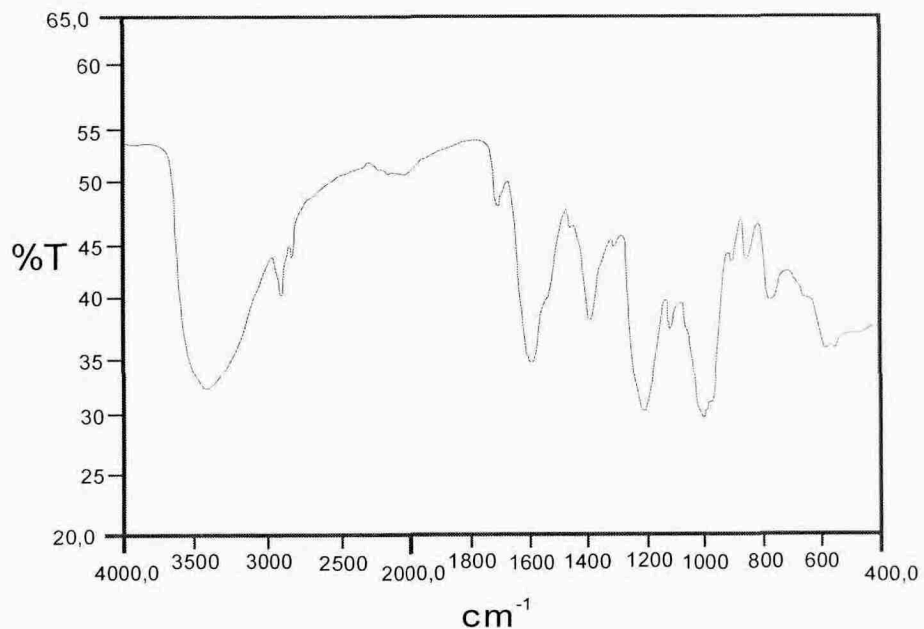


Figura 7 - Infravermelho da Heparina Esterificada.



O infravermelho da heparina despolimerizada, apresentado na Figura 8, confirma a quebra do polímero, uma vez que o infravermelho deste é semelhante ao da heparina comercial.

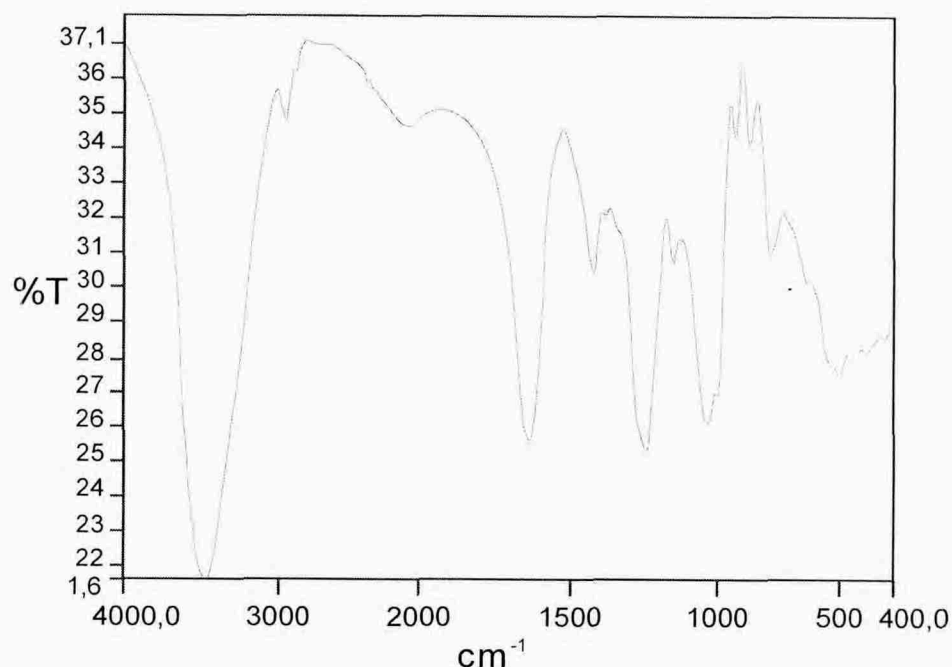


Figura 8 - Infravermelho da Heparina Despolimerizada.

#### 4.2.2. Análise Elementar

A heparina também foi caracterizada por análise elementar que comprova a esterificação pelo aumento no número de carbonos da molécula esterificada; a despolimerização confirma que a quebra do polímero foi efetiva, uma vez que os valores de C, H, N e S retornaram aos valores iniciais (Tabela 2).

Tabela 2: Análise elementar.

Nome da Amostra	Nitrogênio	Carbono	Hidrogênio	Enxofre
Heparina Pura	1,893	18,708	4,119	6,275
Heparina Esterificada	1,980	31,553	5,074	2,172
Heparina Despolimerizada	1,672	19,852	3,546	5,709

### 4.2.3. Análise da Titulação Condutimétrica

Instrumentos e material para realizar titulações condutimétricas são geralmente baratos e simples. Por isso essas medidas são largamente empregadas na indústria como ferramenta analítica tanto em laboratórios como também a nível industrial em processos de controle de qualidade. Um dos usos mais freqüentes da condutância é nas titulações quantitativas de sistemas onde a condutância da solução varia de tal maneira (antes e depois do ponto final da titulação) que a intersecção de duas retas permitem determinar o ponto de equivalência. A forma da curva depende: da amostra, do titulante, das reações que ocorrem.

Titulações condutimétricas de uma solução de heparina e do éster benzílico da heparina foram conduzidas para determinar o grau de esterificação através da quantificação dos grupos sulfatos e carboxílicos (Figuras 9 e 10).

A razão dos teores de grupamentos sulfatos e carboxilatos podem ser identificadas pelas inclinações da curva condutimétrica. A condutividade da solução da amostra é inicialmente alta principalmente devido à contribuição de prótons dos grupos sulfatos ( $\lambda = 350$ ), diminuindo linearmente os prótons  $-\text{SO}_3\text{H}$  que são substituídos por íons  $\text{Na}^+$  ( $\lambda = 50$ ), a quantidade de grupos sulfatos foi de 3,71 mmol/g de heparina. Depois que todos os prótons são neutralizados, há um nivelamento da curva. Esta região do platô corresponde ao próton dissociado do grupo carboxílico.

A condutividade dificilmente muda nesta região devido ao efeito compensatório de prótons carboxílicos neutralizados, aumentando a concentração do íon  $\text{Na}^+$ , a quantidade de grupos carboxílicos foi de 1,03 mmol/g de heparina. Depois de dissociado e neutralizado todos os prótons carboxílicos, a condutividade aumenta agudamente, principalmente devido à contribuição do íon  $\text{OH}^-$  ( $\lambda = 198$ ). A extrapolação da curva condutimétrica forneceu dois pontos de intersecção, o primeiro corresponde ao número de grupos  $-\text{SO}_3\text{H}$  enquanto o segundo corresponde ao número de grupos  $-\text{COOH}$ .

A razão de grupamentos carboxilatos / sulfatos ( $R = N_{\text{COOH}} / N_{\text{SO}_3\text{H}}$ ) da heparina de partida foi de 0,49.

$$\frac{\text{COOH}}{\text{SO}_3\text{H}} = \frac{0,49}{1,00}$$

$$1,49 \longrightarrow 100\%$$

$$0,49 \longrightarrow X$$

$X = 32,9\%$

E após a esterificação, a razão diminuiu para 0,25.

$$\frac{\text{COOH}}{\text{SO}_3\text{H}} = \frac{0,25}{1,00}$$

$$1,25 \longrightarrow 100\%$$

$$0,25 \longrightarrow X$$

$X = 20,0\%$

$$32,9 - 20,0 = \boxed{12,9\%}$$

A diferença dos valores foi o que modificou na estrutura da heparina. Portanto o grau de esterificação foi de 12,9 %.

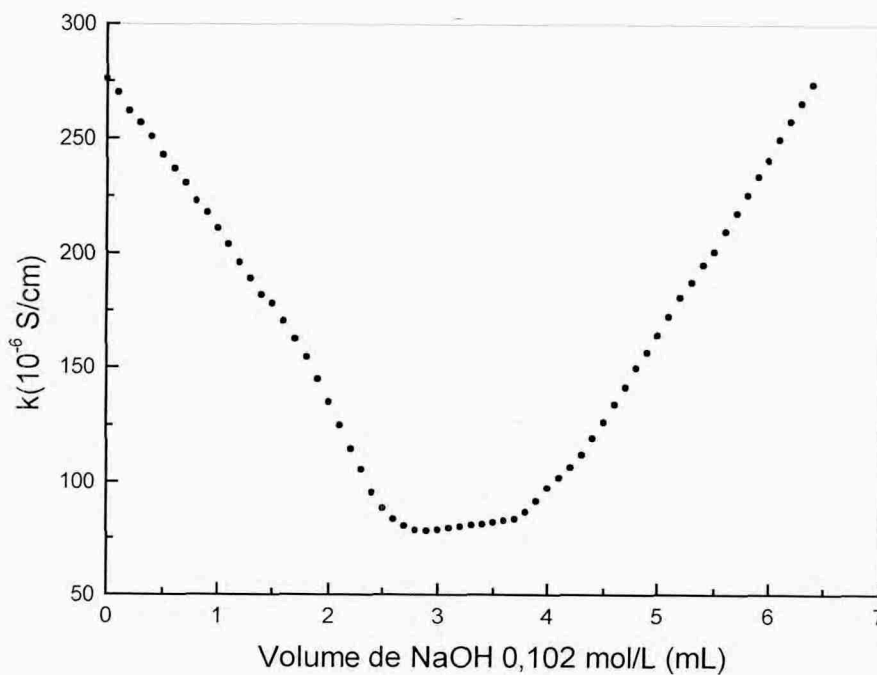


Figura 9 – Titulação Condutimétrica da Heparina.

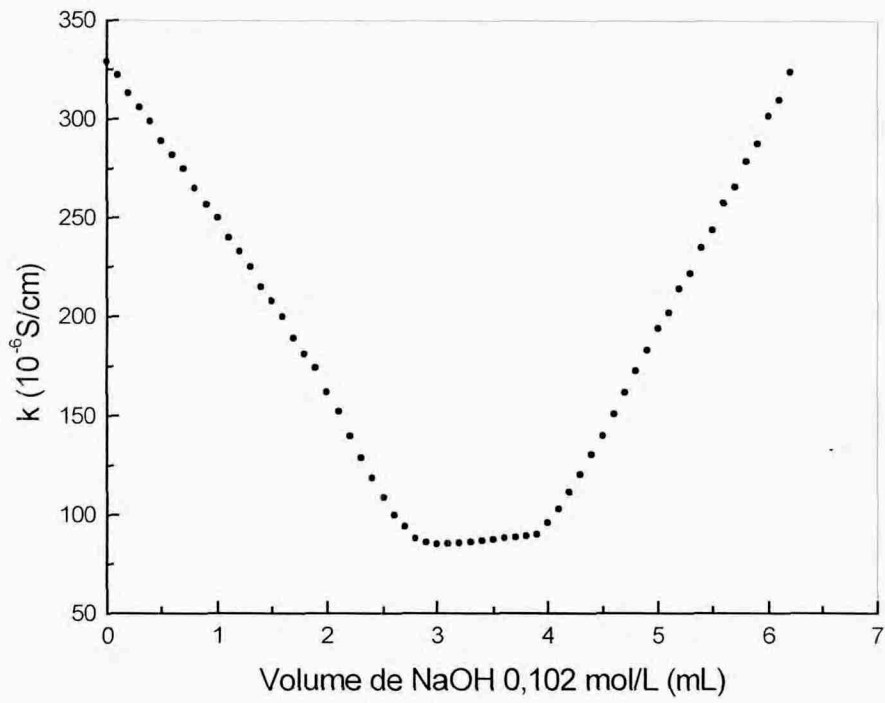


Figura 10 – Titulação Condutimétrica da Heparina Esterificada.

#### 4.2.4. Análise da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A massa molar da heparina e heparina despolimerizada foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência pelo método da exclusão, que efetua a separação de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. As moléculas pequenas podem penetrar na maioria dos poros e apresentarem um maior tempo de retenção, enquanto as maiores são excluídas de todos os poros. Assim, moléculas grandes movem-se rapidamente através da coluna e as moléculas pequenas são eluídas lentamente pela fase móvel. Na tabela 3 encontram-se os valores obtidos por esta técnica.

Tabela 3: HPLC.

HPLC	Tempo de Retenção (min.)	Porcentagem em área (%)	Massa Molar (Kda)
Heparina Pura	9,783	89,0	12,8
	10,5	3,0	11,2
	11,298	8,0	10,0
Heparina Despolimerizada	7,692	15,0	12,8
	9,533	42,0	11,2
	11,082	8,0	10,0
	13,3	35,0	6,9

Os resultados obtidos para heparina pura (Figura 11) mostraram que 89% das cadeias poliméricas apresentam massa molar de 12.800 daltons (Da), 3% das cadeias poliméricas apresentam 11.200 Da e 8% das cadeias poliméricas apresentam 10.000 Da. Para a heparina despolimerizada (Figura 12), os resultados mostraram que 15% das cadeias poliméricas apresentam massa molar de 12.800 Da, 35% das cadeias poliméricas apresentam 6.900 Da e 50% das cadeias poliméricas possuem massa molar entre 12.800 e 6.900 Da. Os resultados da despolimerização foram satisfatórios, uma vez que uma boa porcentagem de heparina apresentou um fragmento de 6.900 Da que seria responsável pela diminuição atividade anticoagulante necessária para administração via oral.

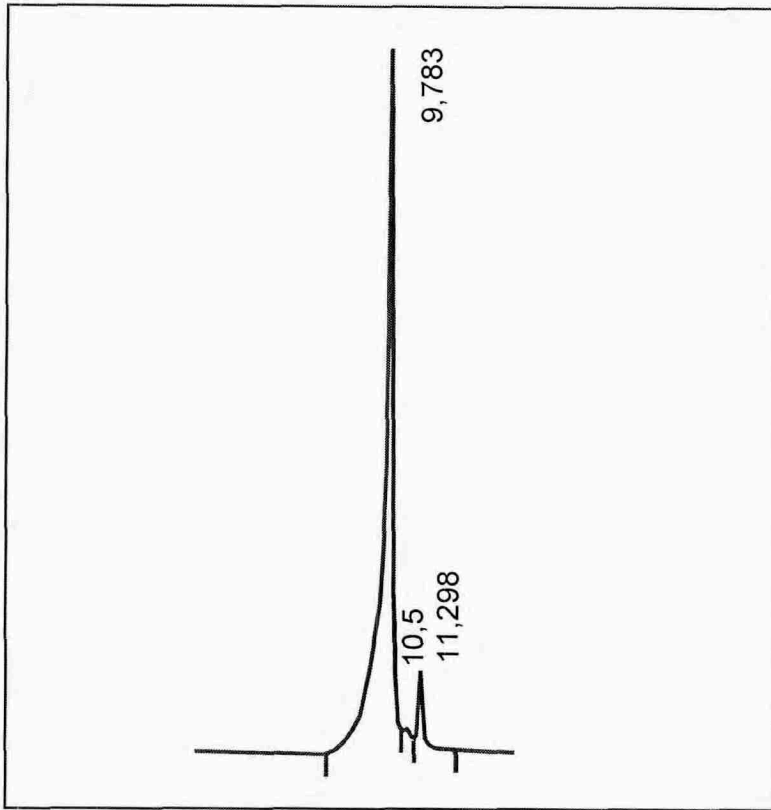


Figura 11 – Cromatograma da Heparina Pura.

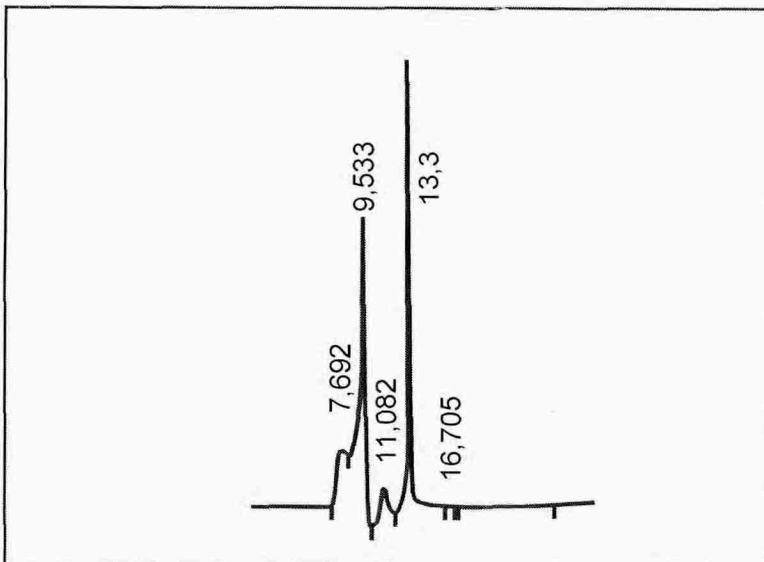


Figura 12 – Cromatograma da Heparina Despolimerizada.

#### 4.2.5. Análise da Atividade Anticoagulante

As análises de atividade anticoagulante foram feitas por testes de tromboplastina parcial (TTP), ou seja, tempo de formação do coágulo.

Para a preparação das amostras foi utilizado citrato de sódio após a coleta de sangue, pois este é um anticoagulante padrão usado para a realização de testes de coagulação. Após é centrifugado para a separação de soro e plasma.

Para a dosagem de heparina foram preparadas soluções com salina isotônica, pois esta não irrita e nem retarda a cicatrização, pode ser utilizada em todas as feridas limpas.

Foi adicionado DiaCelin que é a cefalina de cérebro de coelho com complexo de caolim. A cefalina ativa os fatores do sistema intrínseco de coagulação no plasma, na presença de íons de cálcio, função esta do cloreto de cálcio.

Devido sua alta sensibilidade para heparina, DiaCelin pode ser usado para dosagem de heparina.

O tempo de coagulação depende da concentração dos fatores VII, IX, XI e XII, e também dos fatores I, II, V e X. A ativação por contato pelo complexo de caolim reduz consideravelmente o tempo de coagulação e evita a turbidez.

O mecanismo de ação das heparinas demonstrou a influência da massa molar nas atividades. Estes estudos apresentam uma tendência, onde a atividade desejada está favorecida com o aumento do grau de fragmentação da heparina, ou seja, quanto menor a massa molar, menor é o tempo de coagulação, coagulam mais rápido, maior a atividade coagulante e menor atividade anticoagulante. Os resultados são apresentados na Tabela 4 e comparados na Figura 13.

Tabela 4 – Tempo de Tromboplastina Parcial.

Tempo Tromboplastina Parcial	1	2	3	4	5
Concentração da Heparina (U/mL)	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Heparina Comercial (s)	12	27	36	46	60
Heparina Despolimerizada (s)	10	19	20	29	40

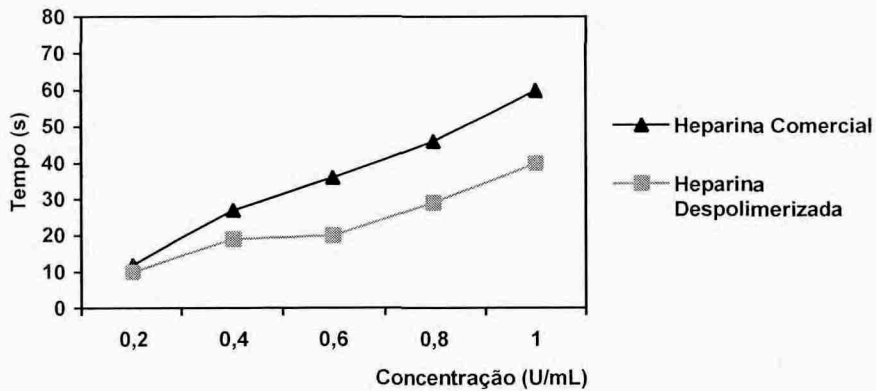


Figura 13 – Tempo de Tromboplastina Parcial.

Estas misturas heterogêneas de polissacarídeos são produzidas através da despolimerização, os quais possuem atividade total anticoagulante mais baixas do que a relatada pela heparina. No entanto, uma das dificuldades associadas a estas heparinas está ligada ao fato de serem produtos muito heterogêneos. Conseqüentemente, torna-se difícil avaliar a contribuição de cada uma das espécies à atividade da heparina, assim como determinar o comportamento destas espécies durante a despolimerização, e finalmente, de controlar a estrutura de tal espécie e as respectivas proporções nos produtos finais.



## 5. CONCLUSÃO

Após a análise e discussão dos resultados obtidos através dos experimentos realizados, bem como das pesquisas bibliográficas, chegou-se a seguinte conclusão:

A síntese proposta para obtenção da heparina de baixa massa molar consistiu de três etapas sucessivas de reações: formação do sal de amônio quaternário com cloreto de benzalcônio, esterificação da heparina com cloreto de 4-clorobenzila, despolimerização com hidróxido de sódio.

A heparina comercial, heparina esterificada e heparina despolimerizada foram caracterizadas pelas técnicas de espectroscopia no infravermelho e análise elementar. A técnica da análise de infravermelho comprovou a presença de todos os grupos funcionais da heparina e de suas modificações, sendo útil para a caracterização dos polímeros.

A análise elementar confirmou a formação do éster de heparina pelo aumento do número de carbonos, bem como a despolimerização pelo retorno ao número de carbonos iniciais. A análise elementar foi uma técnica auxiliar na caracterização dos polímeros obtidos.

A titulação condutimétrica, devido a sua simplicidade, disponibilidade de equipamento, utilização de pequenas quantidades de amostras e reagente simples mostrou ser uma eficiente técnica para quantificar o grau de esterificação da heparina.

A análise da cromatografia líquida de alta eficiência também mostrou ser uma eficiente técnica para determinar a distribuição das massas molares e suas respectivas proporções.

A quebra da heparina, utilizando o processo realizado neste trabalho, resultou numa mistura de frações de massas molares de 12,8, 11,2 e 10,0 e 6,9 kDa, sendo a fração com a menor massa molar com 35% da composição é a responsável pela redução da atividade anticoagulante, e a mistura de frações fornece um equilíbrio entre as atividades anticoagulante e antitrombótica necessária para administração oral.

Tanto a heparina comercial quanto a heparina despolimerizada apresentaram atividade anticoagulante. A heparina despolimerizada foi capaz de diminuir o tempo de coagulação avaliado pelo teste TTP nas concentrações utilizadas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLASS, A. **Processamento de polímeros**. 2ª ed. Florianópolis: Editora UFSC, 1988. 5 p.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. ; BONATO , P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1993. 13-22,99,114 p.
- DEBRIE, R. Mixtures of particular LMW heparinic polisaccharides for the prophylaxis/treatment of acute thrombotic events . **US Pat.** 5, 389, 618, 1995.
- DEVLIN, T. M. – **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 4ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2002. 291- 294 p.
- EBERT, C. D., LEE, E. S., DENERIS, J., KIM, S. W. The Anticoagulant Activity of Derivatized and Immobilized Heparins. In Biomaterials: Interfacial Phenomena and Applications, Cooper, S. L. & Peppas, N. A. Editors, **Advances In Chemistry Series** 199, Washington, D. C.,1982. v. 12, 161-176 p.
- ERLICHE, J., STIVALA, S. S. Chemistry and Pharmacology of Heparin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1973.V.62, n. 4, 517-544 p.
- JOHNSON, E. A., KIRKWOOD, T. B. L., STIRLING, Y., et al. Four Heparin Preparation: Anti-Xa Potentiating Effect of Heparin after Subcutaneous Injection. **Thromb. Haemostas. (Stuttg.)**,1976. v.35, 586-591 p.
- LANE, D. A.; MacGregor, I. R. et al. Molecular Weight Dependence of the Anticoagulant Properties of Heparin: Intravenous and Subcutaneous Administration of Fractionated Heparins to Man. **Thrombosis Research**,1979. v. 16, 651-662 p.
- LUCAS, E. F.; MONTEIRO, E.;SOARES, B. G.- Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica. RJ: e-papers, 2001. 366p.

MANO , E. B. - **Introdução a polímeros**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 1985. 1-13, 19,43 p.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry – reactions, mechanisms, and structure**. 3ª ed: Wiley-Interscience, 1985.

MILES, D. C. ; BRISTON , J. H. **Tecnologia dos polímeros**. São Paulo: Editora Polígono S.A., 1975. 3 p .

NELSON, D. L. ; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3ª ed: Sarvier editora de livros médicos Ltda, 2002. 237 p.

PAVÃO, M. S. G.; MOURÃO, P. A. S.; et al. A Unique Dermatan Sulfate-like Glycosaminoglycan from Ascidian. **The Journal of Biological Chemistry**. 1995.V. 270, n. 52, 31027-31036 p.

ROSEMBERG, R.D.; ROSEMBERG, J.S. – **Natural anticoagulant mechanism**. J. Clin. Invest.74 : 1, 1984.

SALIH, O. K., CELIK, S. K., TOPÇUOGLU, M. S., et al. The Effect of Low Molecular Weight Heparin (Fraxiparine = Nadroparine Calcium) on Full Heparinization. **Ann. Med. Sci.**, 1997. v.6. 72-75 p.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**: Editora Artmed, 2000. 207 – 209 p.