

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO DE ESPONJAS BIOPOLIMÉRICAS
CONTENDO BIOMASSA DE CIANOBACTÉRIA PARA
CONTENÇÃO DE HEMORRAGIAS**

GUSTAVO VENÍCIUS DA SILVA SANTOS

ARACAJU
2024

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO DE ESPONJAS BIOPOLIMÉRICAS
CONTENDO BIOMASSA DE CIANOBACTÉRIA PARA
CONTENÇÃO DE HEMORRAGIAS**

Dissertação de Mestrado submetida
à banca examinadora para obtenção
do título de Mestre em Saúde e
Ambiente, na área de concentração
em Saúde e Ambiente.

GUSTAVO VENÍCIUS DA SILVA SANTOS

ORIENTADORA

**Profa. Dra. Juliana Cordeiro Cardoso
Profa. Dra. Sônia Oliveira Lima**

ARACAJU
2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

S237d Santos, Gustavo Venícius da Silva
Desenvolvimento de esponjas biopoliméricas contendo biomassa de cianobactéria para contenção de hemorragias [manuscrito] – Aracaju, SE : 2023.
77 f.: il. color.

Orientadora: Dra. Juliana Cordeiro Cardoso.
Orientadora: Dra. Sônia Oliveira Lima.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, 2023.

1. Spirulina. 2. Biopolímeros. 3. Hemostasia. I. Cardoso, Juliana Cordeiro, orient. II. Lima, Sônia Oliveira, orient. III. Título.

CDU: 616-089.811

Ficha elaborada por Marcos Breno Andrade Leal (CRB-5/2048)

**DESENVOLVIMENTO DE ESPONJAS BIOPOLIMÉRICAS CONTENDO
BIOMASSA DE CIANOBACTÉRIA PARA CONTENÇÃO DE HEMORRAGIAS**

Gustavo Venícius da Silva Santos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A
OBTENÇÃO DE TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:

Juliana Cordeiro Cardoso, Dra.
Orientadora

Sônia Oliveira Lima, Dra.
Orientadora

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Maria Nogueira Marques, Dra.
Universidade Tiradentes

ARACAJU
Março - 2024

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora, Juliana Cordeiro Cardoso, por toda paciência, dedicação, sabedoria e amor ao que faz. Em meio à tantas incertezas que senti, me ensinou a ser paciente, resiliente e a ser um pesquisador melhor, muito do que aprendi devo a senhora. Meu muito obrigado por me acolher, me ouvir e me educar como uma mãe.

À minha segunda Orientadora, Sônia Lima, por ser tão solícita, pontual, breve e assertiva em suas orientações. Obrigado por tantas contribuições em poucos encontros.

Aos meus professores do PSA, em nome das professoras Margarete e Cláudia, que de alguma forma deixaram comigo um pouco de suas personalidades e sabedoria.

À minha banca examinadora, professor Ricardo Albuquerque e Maria Nogueira por todo o cuidado com a avaliação do meu trabalho.

Às agências de Fomento CAPES e FAPITEC pelo investimento concedido na execução desta pesquisa e na minha formação.

Aos meus amigos de trabalho e da vida, em especial a Thigna, Láisa, Adão, Allef e Kelisson em nome de todo o Lbmat. Em nome do Lnmed, às minhas amigas Érika e Victoria, que desde o início, com muita paciência e atenção sofreram minhas dores comigo e, assim como os demais anteriormente citados, me ajudaram a crescer e a entender um pouquinho da pesquisa experimental. À Deborahlys por cada boa recepção, confiança, pela amizade construída ao longo dessa jornada e resolutividade em todos os dias de trabalho.

Aos meus amigos, que tornaram a minha vida mais leve e feliz durante essa jornada em nome de Aislayne, Hellen, Larissa, Gleison, João Vitor, Sávyo e Kaique.

À minha mãe, fonte de sabedoria, carinho e amor, que me fez a pessoa que sou hoje e continua a me lapidar diariamente através dos seus exemplos. Ao meu pai, homem nobre, sábio e forte, que assim como minha mãe, é um dos maiores exemplos de ser humano que eu já vi, quero, algum dia, me tornar um pouco do que vocês são. À minha irmã Glenda, que mesmo crescida, continua a ser a minha criança e me ensina tanto com tão pouca maturidade. Às minhas tias Diana e Jacqueline e aos meus tios Geovane e Júnior que, desde pequeno, tomam para si os lugares dos meus pais para cuidar de mim, me educar e não deixar que nada me falte. Às minhas avós Maria, Valdice (*in memoriam*) e Zefira (*in memoriam*). Aos meus avós Gelmo, Raimundo e Dionísio (*in memoriam*). A todos vocês, obrigado por terem sido a minha fortaleza, minha rocha, meu sustento, por serem a presença viva de Deus na minha vida e me aproximarem dele a cada dia.

A Deus, que com seu infinito amor, cuida de mim desde antes da minha chegada a este mundo, obrigado pela sua misericórdia, por não ter me permitido desistir e pela família que me deste. Sinto o seu cuidado em cada decisão e fase da minha vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO GERAL.....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 MATERIAIS.....	32
4.2 MÉTODO.....	32
4.2.1 Cultivo da <i>Anabaena Cylindrica</i>.....	32
4.2.2 Caracterização das biomassas.....	34
4.2.2.1 Determinação de ficocianinas (fração aquosa).....	34
4.2.2.2 Determinação de carotenoides e clorofilas a e b (fração lipídica).....	35
4.2.3 Obtenção e caracterização dos extratos para identificação da vitamina k1.....	35
4.3 Desenvolvimento da formulação preparada com espirulina.....	36
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPONJAS.....	36
4.4.1 Análise macroscópica das esponjas.....	38
4.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier.....	38
4.4.3 Análise de intumescimento	38
4.4.4 Análise Térmica.....	38
4.4.4.1 Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	38
4.4.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA)	38
4.4.5 Teste mecânico.....	39
4.5. Ensaio de Coagulação	39
4.6 Análise estatística	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CIANOBACTÉRIAS.....	40
5.1.1 Cultivo da <i>A. cylindrica</i>	40
5.1.2 Determinação das ficocianinas totais	42
5.1.3 Determinação das clorofilas a e b e carotenoides totais.....	43
5.1.4 Identificação de vitamina k1 das amostras.....	47
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPONJAS.....	49
5.2.1 Desenvolvimento da formulação preparada com espirulina e análise macroscópica.....	49
5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	50
5.2.3 Análise de Intumescimento.....	52
5.2.4 Calorimetria Diferencial de Varredura e Análise Termogravimétrica.....	55

5.2.5 Teste mecânico.....	59
5.2.6 Testes de coagulação do sangue total <i>in vitro</i>	61
Conclusões.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
Anexo I - Aprovação do CEUA.....	77

DESENVOLVIMENTO DE ESPONJAS BIOPOLIMÉRICAS CONTENDO BIOMASSA DE CIANOBACTÉRIA PARA CONTENÇÃO DE HEMORRAGIAS

Gustavo Venícius da Silva Santos

Resumo

Os elevados índices epidemiológicos de óbitos por traumas hemorrágicos e a necessidade de intervenção imediata à esta problemática, tornam promissor o uso de uma fonte rica em vitamina K1 para o desenvolvimento de um produto hemostático compressivo. Assim, este composto foi explorado nas biomassas de microalgas e cianobactérias. O presente estudo teve por objetivo desenvolver uma esponja hemostática de alginato e quitosana contendo a biomassa da cianobactéria espirulina (*Arthrospira platensis*). Optou-se pelo complexo polieletrólito destes polímeros por sua biocompatibilidade já demonstrada na literatura. O teor de vitamina K1 foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência. Os teores de clorofilas a e b, carotenoides totais e ficocianina, por métodos espectrofotométricos. A esponja foi desenvolvida a partir da mistura das dispersões de alginato e quitosana, contendo ou não a espirulina, por congelamento e liofilização. As amostras foram caracterizadas por FTIR, teste de intumescimento, DSC e TGA, teste mecânico, teste do índice de coagulação do sangue. O alto custo associado às condições de cultivo favoreceu à elegibilidade da biomassa da espirulina (*Arthrospira platensis*), que embora tivesse a menor quantidade de vitamina K1 e carotenoides que as demais, pode ser adquirida comercialmente por um baixo custo. Na análise de FTIR, esponjas de alginato com espirulina apresentam intensificação de todas as bandas espectrais quando comparadas às esponjas de alginato, sugerindo uma forte interação química entre o polímero e a biomassa incorporada. Nos testes de intumescimento, esponjas de quitosana pura e com espirulina, bem como as com alginato puro, absorvem maior quantidade de água, intumescendo quase 600% nas primeiras 02h. Na análise térmica, a esponja de alginato mostra menor perda de massa e maior estabilidade térmica, enquanto outras perdem mais da metade da massa a temperaturas menores que 300°C, podendo inferir que a inserção da espirulina altera o perfil térmico dos polímeros, sobretudo o de alginato. Em relação a atividade coagulante, até 5 minutos, todas as esponjas têm propriedades coagulativas favoráveis, exceto as esponjas de alginato puro e as contendo quitosana. Em 10 minutos, esponjas de alginato exibem drástica evolução em relação às demais. Concluiu-se que esponjas contendo espirulina têm potencial hemostático.

Palavras-chaves: Spirulina; Biopolímeros; Hemostasia.

DEVELOPMENT OF BIOPOLIMER SPONGES CONTAINING CYANOBACTERIAL BIOMASS TO CONTAIN BLEEDING

Gustavo Venícius da Silva Santos

Abstract

The high epidemiological rates of death due to hemorrhagic trauma and the need for immediate intervention in this problem make it promising to use a source rich in vitamin K1 to develop a compressive hemostatic product. This compound has therefore been explored in microalgae and cyanobacterial biomass. The aim of this study was to develop an alginate and chitosan hemostatic sponge containing the biomass of cyanobacteria (*Arthrospira platensis*). The polyelectrolyte complex of these polymers was chosen because of its biocompatibility, which has already been demonstrated in the literature. The vitamin K1 content was determined by high-performance liquid chromatography. The levels of chlorophylls a and b, total carotenoids and phycocyanin were determined by spectrophotometric methods. The sponge was developed from a mixture of alginate and chitosan dispersions, with or without spirulina, by freezing and lyophilization. The samples were characterized by FTIR, swelling test, DSC and TGA, mechanical test and blood clotting index test. The high cost associated with the cultivation conditions favored the eligibility of spirulina biomass (*Arthrospira platensis*), which although it had the lowest amount of vitamin K1 and carotenoids than the others, can be purchased commercially at a low cost. In the FTIR analysis, alginate sponges with spirulina showed intensification of all the spectral bands when compared to alginate sponges, suggesting a strong chemical interaction between the polymer and the incorporated biomass. In the swelling tests, pure chitosan and spirulina sponges, as well as pure alginate sponges, absorbed more water, swelling by almost 600% in the first 2 hours. In the thermal analysis, the alginate sponge shows less loss of mass and greater thermal stability, while the others lose more than half their mass at temperatures below 300°C, suggesting that the insertion of spirulina alters the thermal profile of the polymers, especially the alginate. With regard to coagulating activity, up to 5 minutes, all the sponges have favorable coagulating properties, except for pure alginate sponges and those containing chitosan. At 10 minutes, alginate sponges show a drastic improvement over the others. It was concluded that sponges containing spirulina have hemostatic potential.

Keywords: Spirulina; Biopolymers; Hemostasis.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as mortes por causas externas, a hemorragia descontrolada está entre as principais desencadeadoras das mortes por causas evitáveis, podendo representar até 40% entre os óbitos registrados (JHONSON, 2014; PFEIFER 2009 apud CALLCUT 2019). A perda volêmica desencadeada pelo processo hemorrágico favorece ao estado de choque hipovolêmico que, quando não interrompido e tratado pode levar à exsanguinação, causa de morte comum no cenário intra-hospitalar (KORNBLITH; MOORE; COHEN, 2019).

Os torniquetes, dispositivos utilizados pelos serviços de atendimento às emergências no tratamento de traumas hemorrágicos, quando usados de maneira prolongada podem causar efeitos iatrogênicos (TREAGER *et al.*, 2021). Ademais, outros dispositivos hemostáticos de aspecto esponjoso foram desenvolvidos e são utilizados para a contenção de sangramentos cirúrgicos, como esponjas biopoliméricas (hemostáticos mecânicos), selantes líquidos (hemostáticos adesivos) e produtos em formas de grânulos ou pó (curativos hemostáticos). Entretanto, ainda há pouca comprovação científica quanto aos riscos e benefícios ofertados por estes (CHIARA *et al.*, 2018).

A hemostasia corresponde ao equilíbrio entre os processos de coagulação e anticoagulação. O processo de hemostasia se inicia de modo imediato em resposta a uma lesão vascular. Este processo ocorre por meio da interação entre células do endotélio vascular, plaquetas, fatores de coagulação, fator de VonWillebrand e vitamina K que atuam sinergicamente visando à formação de um tampão plaquetário e atenuação do sangramento (SIERRA; MORENO; GARCÍA-RUIZ, 2022).

A vitamina K, após absorvida, é armazenada no fígado e contribui para a ativação normal de fatores da cascata de coagulação como a Protrombina (II) Proconvertina (VII), Fator Christmas (IX) e Stuart-Prower (X). Portanto, a ausência de vitamina K ou a presença de doença hepática, que impeça a formação normal da vitamina K1, pode diminuir os níveis destes fatores a ponto de causar uma tendência à hemorragia. Sendo assim, torna-se notória a importância desta substância na estimulação da cascata coagulativa (LIEBMAN; FURIE; FURIE, 1982).

O elevado potencial de mortalidade por traumas hemorrágicos e a necessidade de intervenção imediata à esta problemática torna estratégica a busca de um produto capaz de controlar as hemorragias. As microalgas e cianobactérias são fontes ricas em vitamina K e outras vitaminas lipossolúveis e o uso destas para a incorporação em formulações compressivas pode ser promissor (NOURI *et al.*, 2018; TARENTO *et al.*, 2018; LUJBIC *et al.*, 2020).

Arthrospira é o nome dado ao gênero de cianobactérias que possuem baixo custo de produção, toxicidade desconhecida e ampla distribuição mundial. (ISMAIEL; EL-AYOUTI; PIERCEY-NORMORE, 2016). Estas espécies de cianobactérias passaram a ser conhecidas por Spirulina/Espirulina, tendo em vista o seu aspecto morfológico espiralado (ALFADHLY *et al.*, 2020). Além disso, o alto potencial de reprodução, o baixo custo empregado a este processo, e a biomassa rica em princípios ativos de potencial cicatrizante, antioxidante, anti-inflamatório, despertou o interesse de indústrias de diversos segmentos ao cultivo desta, fazendo com que fossem comercializadas (GUNES *et al.*, 2017; GOMÉZ *et al.*, 2023).

O uso de microalgas e cianobactérias como fontes de vitamina K1 foi investigado por Tarento *et al.* (2018), que compararam a quantidade deste composto na biomassa de diversas espécies. De acordo com o estudo realizado por ele, a biomassa seca da cianobactéria *A. cylindrica* apresentou maior quantidade de vitamina K1 do que qualquer outro recurso já explorado (233 µg/g), inclusive que a da espirulina (0,3 µg/g). Este micro-organismo ainda é pouco explorado, mas alguns estudos já investigaram o seu potencial como biofertilizante em hortas de trigo e milho (KHOLSSI *et al.*, 2022; GAVILANES *et al.*, 2023).

A quitosana é um material orgânico desenvolvido por meio da desacetilação da quitina, principal biomaterial responsável na composição do exoesqueleto de artrópodes, bivalves e da parede celular de alguns fungos (DU, 2021). As propriedades bioativas, biocompatíveis, biodegradáveis, atóxicas, anti-infecciosa e hemostáticas desse biopolímero contribuíram para a produção de produtos hemostáticos (ZHAO *et al.*, 2021). O alginato é um biopolímero aniônico oriundo de algas marrons e bactérias, muito utilizado na área industrial biomédica pelo baixo custo, amplo potencial carreador de fármacos, alta taxa de absorção de água, baixa toxicidade, boa biocompatibilidade e biodegradação (GARCIA-CRUX; FOGGETTI; SILVA, 2008). Quando associados, formam um polieletrólito que dá a estrutura de uma esponja com potencial hemostático.

Com base em consulta pública no Instituto Nacional de Propriedade Industrial Brasileiro (INPI), não foram encontradas patentes de um produto hemostático utilizando estas biomassas como agentes hemostáticos. A incorporação da biomassa de cianobactérias e microalgas ou de seus extratos lipídicos em formulações compressivas na forma de esponjas poliméricas pode gerar um produto passível de conter a hemorragia. Assim, o presente estudo teve como objetivo estudar o potencial hemostático de esponjas de alginato e quitosana contendo estes produtos de origem natural.

2. OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma esponja hemostática de alginato e quitosana contendo biomassa de cianobactéria

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o teor de carotenóides, clorofilas e ficocianinas nas microalgas e cianobactérias por métodos espectrofotométricos;
- Identificar a presença de vitamina K1 nas frações apolares de extratos de microalgas e cianobactérias utilizando cromatografia líquida de alta eficiência
- Determinar as condições ideais para a obtenção de esponjas contendo polissacarídeos e espirulina.
- Caracterizar as esponjas obtidas por meio de análise térmica, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, índice de intumescimento.
- Avaliar o potencial hemostático *in vitro* das esponjas

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 EVENTOS HEMORRÁGICOS

Estima-se que, anualmente, em todo o mundo, aproximadamente 6 milhões de pessoas morrem em decorrência de lesões e eventos traumáticos. Destes, somente 50% são por choque hemorrágico (PENG *et al.*, 2023 apud BICKELL *et al.*, 1994). Segundo Curry e Davenport (2019), as lesões traumáticas em sua maioria, desencadeiam processos hemorrágicos e uma hemorragia não controlada representa a causa de morte evitável mais comum entre indivíduos de até 40 anos de idade.

Cannon (2018) afirma que somente nos Estados Unidos são registradas cerca de 60.000 mortes anuais por este agravo e que este valor pode chegar a quase dois milhões quando se avalia dados mundiais. De acordo com Mitra *et al.* (2014), vítimas de traumas hemorrágicos que recebem transfusão maciça e apresentam sobrevivência, podem apresentar piores resultados funcionais e maiores chances de morte à longo prazo.

Os óbitos decorrentes de eventos traumáticos, incluindo os ocorridos por traumas hemorrágicos, são frequentemente definidos como “óbitos por causas externas”. No que se refere aos aspectos epidemiológicos deste agravo no Brasil, o número de óbitos por causas externas desde 2010 até 2020, representa mais de 1.650.000 casos, sendo 618.021 no ambiente intra-hospitalar, 546.811 em via pública e 491.210 entre “outros estabelecimentos de saúde”, “domicílio”, “outros” e “ignorado” (DATASUS, 2022).

Hemorragia é o nome dado à perda abrupta de sangue subsequente ao rompimento de um ou mais vasos sanguíneos podendo ocorrer para dentro ou fora do corpo humano. Essa ocorrência pode ser tanto um processo natural do corpo em resposta a lesões, como também um sinal de doenças ou traumas (ASATULLAYEV; JABBOROVA, 2022).

As hemorragias externas são aquelas onde há o vazamento de sangue para fora do corpo. Estas podem ser tratadas por meio de compressão e oclusão da lesão. As hemorragias internas, por outro lado, são aquelas em que o vazamento ocorre para outro tecido do corpo, são de difícil identificação e por esse motivo, apresentam maiores riscos de vida (JOCHEMS *et al.*, 2018).

Além disso, as hemorragias também podem ser categorizadas de acordo com o tipo de vaso sanguíneo afetado: arterial, quando há ruptura de uma artéria, que transporta sangue oxigenado do coração para os tecidos; venosa, quando há rompimento de uma veia, que carrega sangue desoxigenado dos tecidos de volta ao coração; e capilar, que ocorre nos vasos sanguíneos menores e mais delicados, chamados capilares (WENTE *et al.*, 2007).

O tratamento de uma hemorragia depende da causa e da gravidade do quadro. Em casos leves, medidas simples de primeiros socorros, como aplicar pressão local, elevar o

membro afetado ou usar curativos e compressas, podem ser suficientes para controlar o sangramento. No entanto, em situações mais graves, podem ser necessários procedimentos cirúrgicos ou medicamentos específicos para controlar a hemorragia. (JOCHEMS *et al.*, 2018).

Em qualquer situação de hemorragia significativa ou que não se resolve com medidas simples, é crucial buscar atendimento médico imediato. A perda excessiva de sangue pode levar a complicações graves e até mesmo colocar a vida em risco. Portanto, é fundamental procurar ajuda médica para um diagnóstico preciso e tratamento adequado (ROSSAINT, 2016).

3.2 HEMOSTASIA

A hemostasia é um processo fisiológico que visa controlar o sangramento após uma lesão vascular. É composto por três etapas principais: vasoconstrição, formação do tampão plaquetário e coagulação sanguínea (TANAKA; KEY; LEVY, 2009). Na fase primária da hemostasia ocorre a formação imediata do tampão plaquetário através da liberação do fator tecidual (Fator VII) em razão de uma lesão no endotélio, à medida que ocorre a vasoconstrição o fator VIII unido ao fator de Von Willebrand estimulam a adesão plaquetária, potencializando a formação do tampão (SIERRA; MORENO; GARCÍA-RUIZ, 2022).

Hemostasia Secundária ou Coagulação é de fundamental importância para a estabilização do tampão plaquetário, é nessa fase ocorre a transformação do fibrinogênio (proteína solúvel) em fibrina (polímero insolúvel) que através da formação e do auxílio de fibras elásticas, estabilizam o tampão formado na primeira fase (LAPELUSA; DAVE, 2019).

Fibrinólise é o nome dado à última etapa da cascata coagulativa, à medida que as outras etapas vão sendo concluídas e o processo de cicatrização se estabelece, o tampão plaquetário e sua fibrina vão perdendo a sua utilidade, com isso, surge a necessidade de remoção do que está sem utilidade, agindo nesse papel de "limpeza" a etapa da fibrinólise, através da quebra do coágulo pela destruição da fibrina (FLORES-RIVERA *et al.*, 2014).

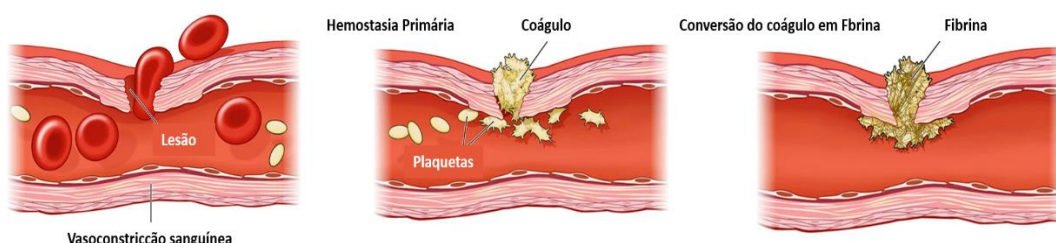


Figura 1. Fases da Hemostasia. Fonte: Traduzido e Adaptado de Cleveland Clinic (2021).

Após uma lesão em um vaso sanguíneo, ocorre a vasoconstrição, que é a contração das células musculares lisas nas paredes do vaso, reduzindo o fluxo sanguíneo no local afetado. Em seguida, as plaquetas sanguíneas aderem e se ativam na área danificada,

formando um tampão plaquetário temporário para interromper o sangramento. De maneira subsequente ocorre a coagulação sanguínea, a última etapa, ativando uma série de reações químicas complexas que levam à formação de uma rede de fibrina insolúvel. Essa rede estabiliza o tampão plaquetário, formando um coágulo sanguíneo que atua como uma barreira física para evitar a perda adicional de sangue e permitindo a cicatrização do tecido lesado (ZUCKER, 1947).

Após o processo de hemostasia, ocorre a reabsorção e remodelação do coágulo, restaurando a normalidade dos vasos sanguíneos. Logo, a hemostasia é essencial para evitar a exsanguinação e promover a regeneração do tecido danificado. Qualquer problema nesse processo pode levar a distúrbios hemorrágicos ou trombóticos, que são condições graves e potencialmente perigosas para a saúde (SATYAM *et al.*, 2019).

3.3 CASCATA DE COAGULAÇÃO

A cascata de coagulação inicia-se de maneira responsiva e imediata à lesão endotelial visando atingir a hemostasia. Os processos envolvidos nesta cascata exigem a participação e coparticipação de diversas substâncias presentes no tecido hematopoiético e nos demais tecidos do corpo humano. Estes processos ocorrem de maneira sequencial e gradativa (FLORES-RIVERA *et al.*, 2014).

Este processo passou a ser denominado de “cascata” devido à maneira sequencial e complexa em que as reações bioquímicas ocorrem para atingir a hemostasia, perpassando por “vias” intrínsecas e extrínsecas que se interconectam após a ativação do Fator Stuart-Prower (X). A ativação da via extrínseca ocorre quando lesões teciduais externas expõem o sangue ao fator tecidual (III). O fator tecidual forma um complexo com a proconvertina (VII), levando à ativação da via comum da coagulação. Esta via é crucial na resposta rápida à lesão vascular e no processo de formação do coágulo.

A via intrínseca, por sua vez, passa a ser ativada quando ocorrem lesões endoteliais, isso pode ser explicado pelo fato de o organismo conseguir identificar que o sangue entra em contato com superfícies estranhas e a presença de colágeno exposto, promovendo o início da cascata coagulativa. Tal contato provoca a ativação do fator de Hageman (XII), que desencadeia em seguida, a ativação dos fatores XI, IX e VIII, resultando na ativação do fator X. A ativação dessa via essencial para a manutenção e preservação do coágulo.

Tanto a via extrínseca quanto a intrínseca, mesmo que ativadas por mecanismos distintos, acabam convergindo na via comum para a ativação do fator X e formação da trombina. A liberação da trombina contribui para a conversão do fibrinogênio em fibrina, que resulta na formação e estabilização do coágulo. A vitamina K1 é de extrema importância para a coagulação do sangue pois é indispensável para que as vias intrínsecas e extrínsecas da cascata coagulativa consigam ser estabelecidas e convergirem, isso acontece porque esta vitamina promove a síntese e o armazenamento de 04 fatores essenciais (II, VII, IX, X) no fígado. A dinâmica das vias que dão início à cascata de coagulação está disposta na Figura 2.

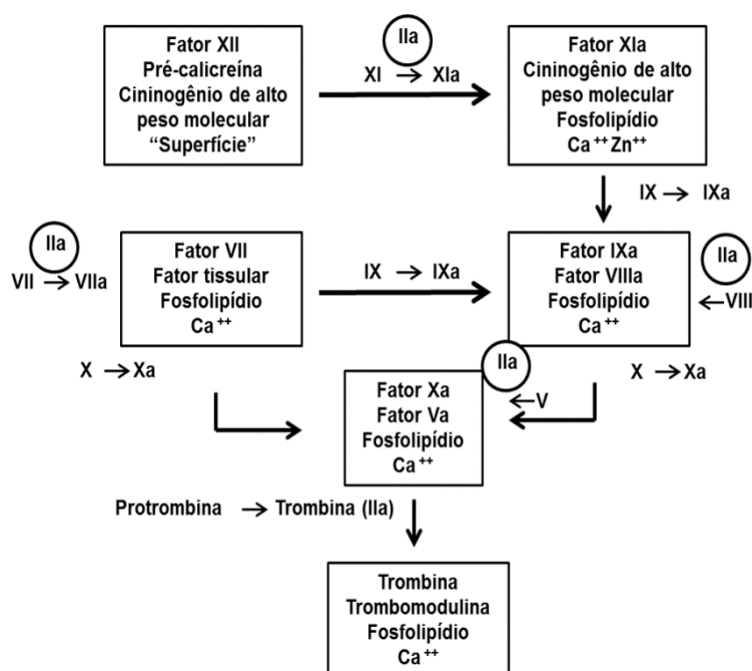


Figura 2. Cascata de coagulação pelas vias intrínseca e extrínseca (modelo antigo); I- Fibrinogênio, II – Protrombina, V-Pró-acelerina, VII-Pró-convertina, VIII- Fator anti-hemofílico, IX- Fator de Christmas, X- Fator de Stuart, XI- Fator de Hagemann, XII-Fator estabilizador de fibrina. **Fonte:** (MANN; BRUMMEL; BUTENAS, 2003).

O processo de coagulação sanguínea é desencadeado quando ocorre uma lesão tecidual. Essa lesão leva à liberação da tromboplastina, uma substância que se combina com outras proteínas e íons cálcio, a fim de desencadear uma série de reações. Essas interações convergem para a transformação de proteínas como o fator X em suas formas ativas, contribuindo para a formação do coágulo sanguíneo (BLOOM, 1990).

Embora houvesse uma concepção simples deste sistema, composta apenas por fatores de coagulação e plaquetas, acredita-se que ele seja mais complexo, envolvendo não apenas tais elementos, mas também componentes celulares e moleculares. O modelo tradicional de cascata, embora tenha oferecido avanço significativo na compreensão do processo, revelou limitações quando observado em contextos clínicos reais (HONG *et al.*, 2020).

Sendo assim, como a ativação do fator IX através da via extrínseca, ressaltam a importância do complexo TF/FVII nesse processo (LAKSHMANAN *et al.*, 2022). Em contraposição ao modelo de cascata, o novo modelo baseado em células descreve que a coagulação é estabelecida por meio de três fases sobrepostas: iniciação, amplificação e propagação (YONG; TOH, 2023).

Na fase de iniciação, as células que expressam o Fator Tecidual (FT) entram em contato com componentes do sangue após uma lesão. O FT, ao se ligar ao Fator VII (FVII), forma um complexo (FVIIa/FT) que ativa os Fatores IX (FIX) e X (FX). Isso desencadeia a formação de pequenas quantidades de trombina, favorecendo a coagulação (CADE *et al.*, 2022). De acordo com Claassen *et al.* (2021), as reações de iniciação ocorrem constantemente, mesmo em indivíduos saudáveis fora do espaço vascular. Essa atividade basal gera pequenas quantidades de fatores ativados, independentemente de lesões vasculares.

Na fase de amplificação, plaquetas e Fator VIII (ligado ao Fator de von Willebrand) entram em ação no local da lesão vascular. Pequenas quantidades de trombina, produzidas durante a fase de iniciação, interagem com essas plaquetas e o complexo Fator VIII/FvW, iniciando o processo hemostático. Isso resulta na formação de um plaquetário inicial, essencial para a hemostasia primária (KIOUPTSI; REINHARDT, 2020).

A fase de propagação é descrita pelo recrutamento de um grande número de placas para o local da lesão e pela produção dos complexos tenase e protrombinase na superfície das placas ativadas. Nesse estágio, a trombina converte a protrombina em fibrina, consolidando o coágulo (SANG *et al.*, 2021).

Para controlar a disseminação da coagulação e evitar a trombose, há quatro anticoagulantes naturais que atuam regulando este processo, sendo eles: inibidor da via do fator tecidual (TFPI), proteína C (PC), proteína S (PS) e antitrombina (AT). Esses componentes regulam a atividade dos fatores de coagulação (DE PABLO-MORENO *et al.*, 2023).

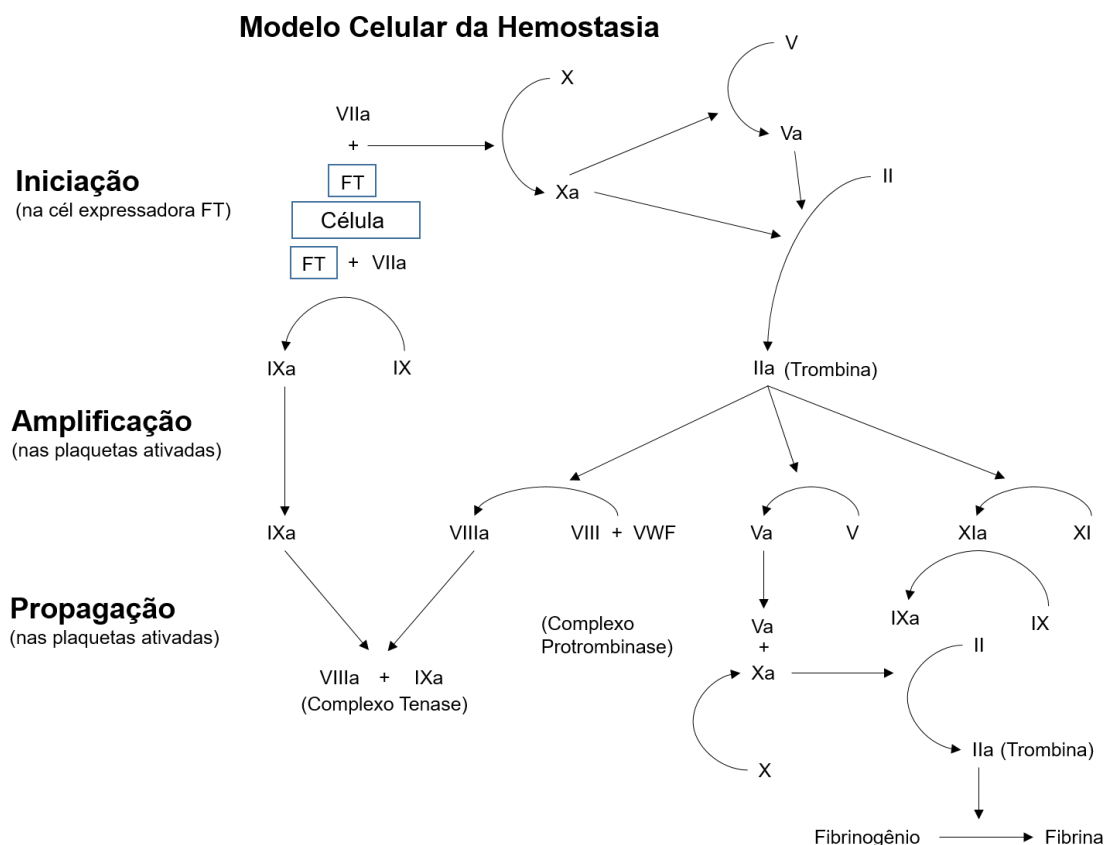


Figura 3. Modelo atual de cascata de coagulação. **Fonte:** Adaptado de Vine (2009).

3.4 MÉTODOS DE CONTENÇÃO HEMORRÁGICA

Existem diversos métodos de contenção hemorrágica utilizados na prática clínica para controlar a perda excessiva de sangue em situações de emergência (DONG; ZHANG; GUO, 2022).

Métodos não medicamentosos são muito utilizados. A compressão direta é considerada o método mais simples e eficaz para o controle de hemorragias externas. Consiste em aplicar pressão direta sobre o local da lesão utilizando uma mão ou um curativo limpo. A compressão direta promove a obstrução dos vasos sanguíneos lesados, interrompendo o fluxo sanguíneo e iniciando o processo de coagulação (BINNETOĞLU *et al.*, 2022).

Além da compressão direta, a elevação do membro afetado é um método utilizado para reduzir o fluxo de sangue para a área lesada. Essa técnica envolve elevar a extremidade sangrante acima do nível do coração, o que auxilia na diminuição do fluxo sanguíneo para o local da hemorragia. A elevação do membro pode ser combinada com a compressão direta, potencializando o controle do sangramento (ZAFREN, 2021).

Em casos de hemorragias graves e quando outras medidas não são suficientes para conter o sangramento, o uso de torniquetes pode ser considerado como último recurso. O torniquete é um dispositivo que comprime a circulação sanguínea em um membro afetado, promovendo o bloqueio do fluxo de sangue arterial. É importante destacar que o uso de torniquetes requer treinamento adequado, pois sua aplicação inadequada ou prolongada pode levar a danos permanentes nos tecidos e nervos do membro afetado (RONCONI *et al.*, 2022).

Métodos utilizando agentes hemostáticos também desempenham um papel importante na contenção de hemorragias. Esses produtos, geralmente na forma de géis, pós ou esponjas impregnadas com substâncias hemostáticas, são aplicados diretamente no local da hemorragia para auxiliar na coagulação e controle do sangramento. Esses agentes atuam acelerando a formação de coágulos sanguíneos e promovendo a hemostasia local (DONG; ZHANG; GUO, 2022).

Ademais, outros dispositivos hemostáticos de aspecto esponjoso foram desenvolvidos e são utilizados para a contenção de sangramentos cirúrgicos, como esponjas biopoliméricas (hemostáticos mecânicos), selantes líquidos (hemostáticos adesivos) e produtos em formas de grânulos ou pó (curativos hemostáticos). Entretanto, ainda há pouca comprovação científica quanto aos riscos e benefícios ofertados por estes (CHIARA *et al.*, 2018).

Em casos mais graves, como hemorragias internas, a intervenção cirúrgica pode ser necessária. A cirurgia proporciona o acesso direto à fonte do sangramento, permitindo o controle da hemorragia por meio de técnicas cirúrgicas, como ligadura de vasos sanguíneos, sutura ou cauterização. A intervenção cirúrgica é indicada em situações em que os métodos não invasivos não são eficazes para controlar o sangramento e quando há risco iminente à vida do paciente (MALIK *et al.*, 2021).

3.4.1. FORMAS FARMACÊUTICAS DE AGENTES HEMOSTÁTICOS

Os agentes hemostáticos podem ser classificados de diversas formas. Uma classificação importante que auxilia na compreensão do mecanismo de ação de cada agente é a classificação com base na forma de atuação. Esta classificação categoriza os agentes hemostáticos em ativos, passivos e vedantes tissulares (HUANG *et al.*, 2021).

Agentes hemostáticos que atuam ativamente são aqueles compostos por trombina e ou fibrinogênio. A utilização dessas substâncias estimula a formação do coágulo de fibrina, por participarem ativamente das etapas finais da cascata de coagulação. O uso desses agentes é indicado, especialmente, para pacientes portadores de distúrbios coagulativos, sejam eles congênitos ou não (HICKMAN *et al.*, 2018).

Os agentes hemostáticos passivos são assim denominados pelo modo de atuação empregado para induzir a hemostasia. Construídos a partir de biopolímeros como gelatina,

celulose, alginato, quitosana e entre outros, são também conhecidos como hemostáticos mecânicos pois auxiliam na agregação e adesão plaquetária por formarem matriz no endotélio lesado. Em contrapartida, estes agentes não são indicados para pacientes com distúrbios de coagulação (KANG; NA; JIN, 2012).

Há ainda, uma nova categoria de dispositivos hemostáticos na qual estão inseridos os vedantes e adesivos tissulares, indicados para a interrupção de sangramentos arteriais, esses dispositivos atuam promovendo a coagulação por se aderirem aos tecidos e serem compostos por substâncias que estimulam a formação do coágulo (NAM; MOONEY, 2012).

O desenvolvimento de produtos hemostáticos deve considerar não somente a forma do produto e o uso de polímeros com este potencial, mas também a incorporação de ativos que favoreçam e potencializem a atividade do mesmo (LIU *et al.*, 2021). Assim, a utilização de esponjas biopoliméricas pode ser considerada uma alternativa promissora ao desenvolvimento de agentes hemostáticos, não só pelas propriedades biodegradáveis, biocompatíveis, atóxicas, como pela capacidade de liberação controlada de fármacos (CASTILLO-HENRÍQUEZ *et al.*, 2021).

Os polissacarídeos, polímeros formados por unidades de açúcares, desempenham um importante papel na engenharia de tecidos devido à sua biocompatibilidade, habilidade de formar estruturas porosas tridimensionais e biodegradabilidade. Ácido hialurônico, quitosana, alginato e celulose são os polissacarídeos mais utilizados para o desenvolvimento de bioprodutos (JIM *et al.*, 2021). A capacidade de se adaptarem à manipulação química, na criação de esponjas porosas e seu potencial para carregamento de fármacos, é o que os torna tão promissores para a engenharia biomédica (SPICER, 2020).

A quitosana é um material orgânico desenvolvido por meio da desacetilação da quitina, principal biomaterial responsável na composição do exoesqueleto de artrópodes, bivalves e da parede celular de alguns fungos (DU, 2021). As propriedades bioativas, biocompatíveis, biodegradáveis, atóxicas, anti-infecciosa e hemostáticas desse biopolímero contribuíram para a produção de produtos hemostáticos (ZHAO *et al.*, 2021).

O alginato é um biopolímero aniônico oriundo de algas marrons e bactérias. É muito utilizado na área industrial biomédica pelo baixo custo, amplo potencial carreador de fármacos, alta taxa de absorção de água, baixa toxicidade, boa biocompatibilidade e biodegradação (GARCIA-CRUX; FOGGETTI; SILVA, 2008). De acordo com Chen (2021), esponjas construídas a partir desse polímero são resolutivas no tratamento de feridas exsudativas, possuem potencial analgésico e podem prevenir o sangramento secundário à uma lesão. Majoritariamente, as esponjas construídas a partir desse biopolímero utilizam também outros polímeros associados.

Quando associados, tais polímeros podem contribuir para a formação e sustentação de esponjas, isso ocorre porque as cargas opostas formam um conjunto polieletrólito que além

de conferir propriedades físicas, tendem a potencializar suas atividades farmacológicas, incluindo o potencial hemostático.

Alguns dispositivos hemostáticos disponíveis comercialmente estão dispostos no Quadro 1.

Quadro 1. Agentes Hemostáticos

Nome comercial / Forma farmacêutica	Princípio ativo	Função/Uso/Características	Mecanismo de ação	Referências
Tisseel® / Selante de fibrina	Fibrinogênio humano purificado e/ou trombina.	• medida adjuvante, após hemostasia cirúrgica • melhora sangramento residual leve ou moderado (exsudação e/ou jorro) • eficazes em casos de distúrbio de coagulação • distúrbios de coagulação espontâneos ou relacionados a medicamentos • caros	• clivagem do fibrinogênio pela trombina • monômeros de fibrina formam matriz solúvel. • ativação do fator XIII em fator XIIIa, • reticulação covalente da matriz de fibrina solúvel • formação do coágulo estável • requer presença de íons de cálcio	(CHIARA <i>et al.</i> , 2018)
Surgicel® / Tela absorvível e estéril	Celulose oxidada regenerada	• cirurgias ortopédicas, neurológicas e torácicas • contra-indicação para pacientes com distúrbios hemorrágicos e trombóticos	• absorvem fluido • formam matriz tridimensional • ativam coagulação pela via extrínseca da cascata.	(BRODBELT <i>et al.</i> , 2002; CHIARA <i>et al.</i> , 2018)
QuikClot Combat Gauze®	Caulim	• controle externo temporário de sangramento traumático • gaze cirúrgica revestida com caulim	• inicia a cascata de coagulação • contato com o endotélio lesado pela via de contato	(CHIARA <i>et al.</i> , 2018)
HemCon® / Bandagens de quitosana	Quitosana	• controle externo e temporário de feridas com sangramento intenso • uso de emergência.	• interação eletrostática direta entre as membranas celulares (carga negativa) dos eritrócitos e a quitosana (carga positiva)	(CHIARA <i>et al.</i> , 2018)
Xstat® / Curativo miniesponjas de celulose de rápida expansão	Celulose	• tratamento de ferimentos por arma de fogo e estilhaços (aplicação injetável)	• esponjas se expandem e incham • preenchem a cavidade da ferida (20 s após o contato com o sangue) • barreira temporária ao fluxo sanguíneo • fornece pressão hemostática.	(RAPOLD; BOCHICCHI O, 2016) (KRAGH <i>et al.</i> , 2015)
Transamin® / Solução injetável	Ácido tranexâmico	• Utilizado para o controle de hemorragias por inibição da fibrinólise	• formação de complexo reversível • desloca o plasminogênio da fibrina • inibição da fibrinólise • inibição da atividade proteolítica da plasmina	(NAPOLITANO <i>et al.</i> , 2013)
Celox® / Pó hemostático	Quitosana	• traumas hemorrágicos	• interage com glóbulos vermelhos e plaquetas • forma coágulo de barreira reticulado, independente de fatores nativos	(KOZEN <i>et al.</i> , 2008)

3.5 VITAMINAS E SUA IMPORTÂNCIA NA PROMOÇÃO DA HEMOSTASIA

Vitaminas são compostos orgânicos essenciais para o funcionamento adequado do organismo. Elas desempenham papéis vitais em diversas funções do corpo, como o metabolismo, o sistema imunológico, a saúde dos ossos, a produção de energia e a regulação de processos bioquímicos (PODKOWA *et al.*, 2021).

As vitaminas não são produzidas pelo corpo em quantidades suficientes, portanto, devem ser obtidas por meio da alimentação ou suplementação. Existem diferentes tipos de vitaminas, como as vitaminas A, B, C, D, E e K, cada uma com funções específicas e fontes alimentares distintas. A deficiência ou excesso de vitaminas pode levar a problemas de saúde (GODSWILL *et al.*, 2020).

As vitaminas diferem em sua estrutura química, funções no organismo, fontes alimentares e necessidades diárias recomendadas. Ademais, tais compostos podem se diferir quanto à sua solubilidade, armazenamento no organismo, necessidades diárias recomendadas, riscos de toxicidade e interações com medicamentos. Das vitaminas citadas, cada uma possui características e papéis específicos no organismo humano (SHAHIDI *et al.*, 2021).

No que se refere ao papel destas, algumas vitaminas possuem papel importante na prevenção de hemorragias, bem como, na regulação do funcionamento normal do processo de hemostasia. A vitamina K, por exemplo, passou a ser conhecida dessa forma em razão do seu expressivo papel na prevenção de hemorragias. O papel de outras vitaminas na coagulação sanguínea, como a C, D e E tem sido investigado (QUICK, 1975; BAYELLE *et al.*, 2002).

As vitaminas supracitadas expressam atividades que contribuem para o processo de coagulação de diferentes formas. As vitaminas E e C, contribuem por meio de suas propriedades antioxidantes, estas, auxiliam na revitalização do epitélio endotelial e com isto, interferem indiretamente no tempo de coagulação (BAYELLE *et al.*, 2002). Estudos sugerem uma relação indireta da vitamina D com a hemostasia, visto que ela é essencial para a absorção de cálcio, e todos os fatores da cascata de coagulação só podem ser ativados na presença deste componente (GHOSHAL; BHATTACHARYYA, 2014).

A vitamina K, por outro lado, exerce papel direto na hemostasia. De aspecto lipossolúvel, esta molécula é considerada essencial para o funcionamento do corpo humano e possui diferentes apresentações que variam conforme sua fonte, biodisponibilidade, alvo e entre outros. Essa substância apresenta três isoformas distintas (ZHANG *et al.*, 2019).

A filoquinona corresponde a uma delas, a “K1”, que pode ser encontrada nas plantas e é a principal responsável pela ativação de proteínas da cascata coagulativa. A “K2” é derivada de bactérias, conhecida como menaquinona, pode contribuir para a prevenção da

osteoporose e atuar na calcificação óssea e a “K3” ou menadiona que corresponde à forma sintética da vitamina K (MLADĚNKA *et al.*, 2022).

A vitamina K desempenha um papel crucial na coagulação sanguínea por meio de sua participação nas características dos fatores de coagulação. Especificamente, ela está envolvida na ativação dos fatores de coagulação II (protrombina), VII, IX e X, bem como das proteínas C e S (YORDANOVA *et al.*, 2018). Esses fatores e proteínas desempenham um papel fundamental na cascata de coagulação, um processo complexo de múltiplas etapas que resulta na formação de coágulos sanguíneos para interrupção de sangramentos (SANG *et al.*, 2021).

A vitamina K atua como um cofator essencial na carboxilação desses fatores de coagulação e proteínas anticoagulantes. A carboxilação é um processo que adiciona grupos de carboxila às proteínas, tornando-as ativas. Sem a presença adequada de vitamina K, a síntese desses fatores de coagulação e proteínas anticoagulantes é comprometida, levando a uma diminuição na capacidade do sangue de coagular eficientemente (BERKNER, 2005).

A carboxilação das proteínas depende da disponibilidade de vitamina K, que é absorvida no intestino delgado a partir da dieta ou produzida por bactérias intestinais. Deficiências de vitamina K podem resultar em problemas de coagulação, causando um aumento no ritmo de sangramento e um risco aumentado de hemorragias (HAO *et al.*, 2021).

Tabela 1. Fontes nutricionais de filoquinona (ng/g)

Fonte vegetal	K1	K2	FK	Referências
Wakame (alga marinha)	12,930	n.d.	n.d.	KAMAO <i>et al.</i> , 2007
Couve	6,180-8,170	n.d.	n.d.	SCHURGERS; VERMEER, 2000; SHEARER; BACH; KOHLMEIER, 1996
Salsinha	3,600-5,480	n.d.	n.d.	KOIVU <i>et al.</i> , 1997; SHEARER; BACH; KOHLMEIER, 1996
Espinafre	2,700-5,750	n.d.	n.d.	BOLTON-SMITH <i>et al.</i> , 2000; KAMAO <i>et al.</i> , 2007; SHEARER; BACH; KOHLMEIER, 1996
Alga marinha desidratada	4,130	n.d.	n.d.	KAMAO <i>et al.</i> , 2007
Repolho	1,270-3,390	0-10	n.d.	KAMAO <i>et al.</i> , 2007; SHEARER; BACH; KOHLMEIER, 1996
Brócolis cozido	1,100-3,070	n.d.	n.d.	BOLTON-SMITH <i>et al.</i> , 2000; KAMAO <i>et al.</i> , 2007; SHEARER; BACH; KOHLMEIER, 1996
Couve de bruxelas	1,220-2,890	n.d.	n.d.	BOLTON-SMITH <i>et al.</i> , 2000; KOIVU <i>et al.</i> , 1997; SHEARER; BACH; KOHLMEIER, 1996
Óleo de soja	1,310-2,340	n.d.	n.d.	BOLTON-SMITH <i>et al.</i> , 2000; FERLAND; SADOWSKI, 1992; KAMAO <i>et al.</i> , 2007; SHEARER; BACH; KOHLMEIER, 1996
Óleo vegetal misturado	1,340-1,640	n.d.	10 (MK-7)	BOLTON-SMITH <i>et al.</i> , 2000; KAMAO <i>et al.</i> , 2007
Óleo de colza refinado	920-1,500	n.d.	0-30 (MK-7)	BOLTON-SMITH <i>et al.</i> , 2000; FERLAND; SADOWSKI, 1992; KAMAO <i>et al.</i> , 2007; SHEARER; BACH; KOHLMEIER, 1996
Margarina	120-1,100	0-3	0-1	BOOTH; SADOWSKI; PENNINGTON, 1995; KAMAO <i>et al.</i> , 2007; PIIRONEN <i>et al.</i> , 1997; SCHURGERS; VERMEER, 2000
Azeite	300-800	0-4	n.d.	BOLTON-SMITH <i>et al.</i> , 2000; FERLAND; SADOWSKI, 1992; KAMAO <i>et al.</i> , 2007; SCHURGERS; VERMEER, 2000; SHEARER; BACH; KOHLMEIER, 1996
Kiwi	343	n.d.	n.d.	KOIVU <i>et al.</i> , 1997
Groselha preta	300	n.d.	n.d.	KOIVU <i>et al.</i> , 1997
Abacate	10-200	n.d.	n.d.	BOOTH; SADOWSKI; PENNINGTON, 1995; KOIVU <i>et al.</i> , 1997; SHEARER; BACH; KOHLMEIER, 1996
Uva verde	83-190	n.d.	n.d.	BOLTON-SMITH <i>et al.</i> , 2000; KOIVU <i>et al.</i> , 1997; SHEARER; BACH; KOHLMEIER, 1996
Natto	200-450	0-10	9,000-12,300 (MK-7)	KAMAO <i>et al.</i> , 2007; SCHURGERS <i>et al.</i> , 1999; SCHURGERS; VERMEER, 2000; SUMI, 1999
Queijo Jarlsberg	60	84	652 (MK-9 (4H))	HOJO <i>et al.</i> , 2007
Queijo Edam	19	33	442	KOIVU-TIKKANEN; OLLILAINEN; PIIRONEN, 2000
Queijo Emmental	52	84	269 (MK-9 (4H))	HOJO <i>et al.</i> , 2007
Carne de frango	0-20	89-600	0-0.1	ELDER <i>et al.</i> , 2006; KAMAO <i>et al.</i> , 2007; KOIVU-TIKKANEN; OLLILAINEN; PIIRONEN, 2000; SCHURGERS; VERMEER, 2000
Fígado de galinha	0-25	40-141	0-2	ELDER <i>et al.</i> , 2006; HIRAUCHI <i>et al.</i> , 1989
Ovo inteiro	3-25	56-250	n.d.	ELDER <i>et al.</i> , 2006; HIRAUCHI <i>et al.</i> , 1989
Gema do ovo	7-70	15 5-640	0-7	ELDER <i>et al.</i> , 2006; KAMAO <i>et al.</i> , 2007; SCHURGERS; VERMEER, 2000
Clara do ovo	n.d.	4-10	n.d.	ELDER <i>et al.</i> , 2006; KAMAO <i>et al.</i> , 2007; SCHURGERS; VERMEER, 2000
Bife de fígado	18-58	7-8	73-1148	HIRAUCHI <i>et al.</i> , 1989; KOIVU-TIKKANEN; OLLILAINEN; PIIRONEN, 2000
Carne bovina	3-7	11-150	0-6	(HIRAUCHI <i>et al.</i> , 1989; KAMAO <i>et al.</i> , 2007; KOIVU-TIKKANEN; OLLILAINEN; PIIRONEN, 2000; SCHURGERS; VERMEER, 2000)

Fonte: adaptado de Tarento *et al.*, 2019. Filoquinona (K1), menaquinona-4 (K2) e outras formas de menaquinonas (FK). “n.d.” denota que nenhum dado estava disponível, MK-7 Isoforma da VK2 produzida por bactérias, (MK-9 (4H)), Isoforma da VK2 presente em queijos fermentados por mais de 90 dias

3.6 Fontes de Vitamina K1: MICROALGAS e CIANOBACTÉRIAS

Microalgas e cianobactérias são organismos microscópicos que desempenham um papel fundamental na ecologia, na produção de oxigênio, na cadeia alimentar aquática e, cada vez mais, na ciência, na indústria farmacêutica e na nutrição humana. Esses dois grupos de organismos possuem importância para a saúde humana e para a indústria farmacêutica (DE OLIVEIRA FERNANDES; CAMARGO-SANTOS; & ZORZAL-ALMEIDA, 2022; IBRAHIM *et al.*, 2023; AMPOFO; ABBEY, 2022).

Uma distinção importante reside na origem celular. As microalgas são organismos eucarióticos, enquanto as cianobactérias são procarióticas. Essa diferença fundamental se relaciona com a estrutura celular, uma vez que as microalgas possuem núcleos celulares definidos, enquanto as cianobactérias não (ANDREEVA *et al.*, 2023).

As microalgas são organismos unicelulares fotossintéticos que são encontrados em diversos ambientes aquáticos, como oceanos, lagos e rios. Elas são conhecidas por sua capacidade de realizar fotossíntese, o processo pelo qual convertem a energia solar em energia química, produzindo oxigênio e capturando dióxido de carbono. Algumas das microalgas mais conhecidas são as do gênero *Nannochloropsis* (FURLAN *et al.*, 2021).

As microalgas são uma fonte rica de nutrientes essenciais, como proteínas, vitaminas, minerais e antioxidantes. Muitas pessoas as consomem em forma de suplementos alimentares devido aos seus benefícios à saúde, incluindo a capacidade de reforçar o sistema imunológico, fornecer energia e contribuir para a desintoxicação do organismo (AMPOFO; ABBEY, 2022).

Além de sua aplicação na nutrição, as microalgas também se destacam como uma fonte rica em compostos bioativos com aplicações significativas na indústria farmacêutica. Uma diversidade de produtos de alto valor derivados desses microrganismos já está presente no mercado. Carotenoides, ácidos graxos, esteróis, poli-hidroxialcanoatos e polissacarídeos são alguns desses produtos (LUJBIC *et al.*, 2020).

Estes micro-organismos também apresentam em sua biomassa uma concentração elevada de diversos tipos de carboidratos, incluindo amido, glicogênio, celulose, ágar e entre outros. Essas substâncias podem ser convertidas de maneira eficiente em açúcares fermentáveis, possibilitando a produção de bioetanol e consolidando a indústria automotiva (KHAN; SHIN; KIM, 2018).

Os carotenóides são substâncias produzidas por microalgas em grandes quantidades, estas moléculas possuem alta atividade antioxidante já demonstrada na literatura.

As cianobactérias, também conhecidas como algas azuis ou cianofíceas, desafiam categorizações ocasionais como algas ou bactérias comuns. São micro-organismos procariontes, semelhantes às bactérias por sua estrutura celular desprovida de membrana

nuclear, mas dotados de um sistema fotossintético composto como ao das algas, organismos eucariontes (DA SILVA, 2022). Esta característica única torna bactérias capazes de fotossíntese. Inicialmente havia discussões a respeito da classificação taxonômica destes micro-organismos, contudo, estudos subsequentes revelaram suas características específicas de bactérias.

Em relação à fotossíntese, ambas compartilham da capacidade de converter a luz solar em energia química, um processo fundamental para a produção de oxigênio e a captação de dióxido de carbono. Uma diferença importante, é que as cianobactérias possuem ficobilissomos, capazes de produzir ficobiliproteínas para auxiliar na captação de luz, essas estruturas ajudam a suprir a ausência da clorofila b existente por microalgas (LI; LI; HO, 2022). As ficobiliproteínas são proteínas pigmentadas produzidas por cianobactérias, são mencionadas como potenciais princípios ativos para produtos farmacêuticos pelas propriedades antibióticas, antivirais e anti-inflamatórias mencionadas (IBRAHIM *et al.*, 2023).

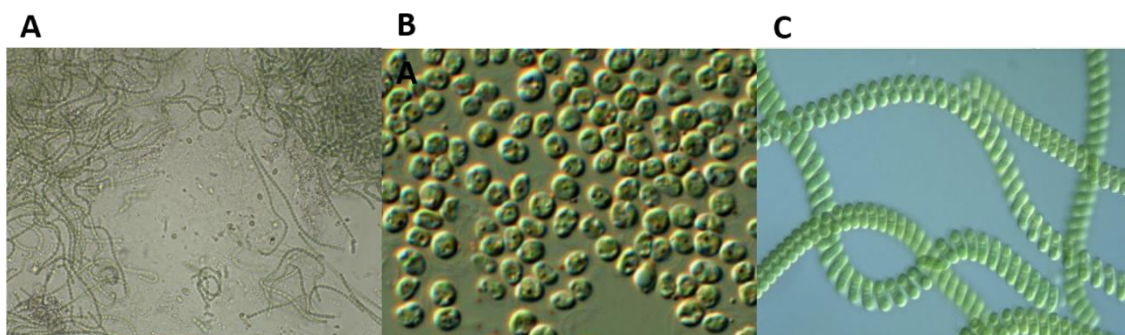
No que diz respeito aos nutrientes, ambos os grupos apresentam uma riqueza de compostos benéficos, embora a composição específica varie entre as diferentes espécies (HASSAN *et al.*, 2022). De acordo com Tarento *et al.* (2018), a espirulina é uma cianobactéria atóxica com uma biomassa rica em macronutrientes como proteínas, carboidratos, fibras dietéticas e gorduras boas. Neste mesmo estudo, também são demonstradas altas quantidades destes compostos em *A. cylindrica*, bem como a presença de vitamina B12 e micronutrientes importantes como potássio, magnésio, cálcio e zinco.

Ademais, as cianobactérias merecem atenção devido à capacidade de algumas espécies em produzir toxinas prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Esse é um desafio que não costuma estar associado às microalgas, que geralmente são consideradas seguras para consumo humano. Portanto, a presença de toxinas é uma distinção crítica a ser considerada ao lidar com cianobactérias (MAFRA *et al.*, 2023).

As toxinas produzidas por cianobactérias são denominadas de cianotoxinas e estão frequentemente presentes no desenvolvimento de inseticidas e herbicidas. Estas substâncias podem ser categorizadas conforme os impactos causados em mamíferos, sendo descritas como hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas e toxinas gastrointestinais. Cianobactérias do gênero *Anabaena*, podem produzir cianotoxinas classificadas como: microcistina, anatoxina-a, homoanatoxina-a, cilindrospermopsina e saxitoxina.

A utilização desses organismos na produção de medicamentos oferece vantagens como a escalabilidade de cultivo, facilidade de manipulação genética e menor impacto ambiental em comparação com outras fontes de compostos bioativos. Embora seja um campo de pesquisa em expansão, o potencial das cianobactérias na indústria farmacêutica representa uma área promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos e terapias especialmente pela possibilidade de serem cultiváveis em ambientes artificiais (BRUGHITTA *et al.*, 2023). Imagens representativas da morfologia das microalgas (B) e cianobactérias utilizadas neste estudo podem ser observadas na Figura 4.

Figura 4. Aspectos morfológicos por vista microscópica de microalga e cianobactérias **A:**



Anabaena cylindrica; B: *Nannochloropsis* sp.; C: *Arthrospira platensis* (Espirulina) **Fonte:** A: Acervo pessoal, 2023; B: Adaptado de Supply (2017) e C: Asghari *et al.* (2016)

3.6.1 MICROALGAS E CIANOACTÉRIAS COMO FONTES DE BIOATIVOS

As cianobactérias têm despertado interesse na indústria farmacêutica devido à sua capacidade de produzir compostos bioativos com potencial terapêutico. Esses microrganismos são fontes promissoras de moléculas com atividades antibióticas, antivirais, antitumorais e antioxidantes. De acordo com Ismail *et al.* (2021) e Gunes *et al.* (2017), ficobiliproteínas da espirulina possuem potencial anti-inflamatório e antioxidante. O extrato etanólico desta mesma microalga, quando associado à nanopartícula de prata, pode apresentar atividades antimicrobianas e antivirais, o que atrai atenção da indústria farmacêutica.

Além disso, as cianobactérias também são estudadas como produtoras de enzimas de interesse agrícola, como fitohormônios e fatores de crescimento vegetal (LU; XU, 2015; HAN *et al.*, 2018; PAN; JEEVANANDAM; DANQUAH, 2019). Os metabólitos secundários produzidos por estes micro-organismos podem contribuir para a fertilização do solo, descontaminação, bem como o desenvolvimento e proteção das plantas contra fatores de estresse (GÓRKA *et al.*, 2018; RONGA *et al.*, 2019).

3.6.1.1. *Anabaena cylindrica*

A *Anabaena cylindrica*, uma cianobactéria filamentosa, apresenta morfologia cilíndrica e é composta principalmente por proteínas, vitamina B12 e filoquinona (233 µg/g), além dos pigmentos clorofila, ficobiliproteínas e beta-caroteno. Destaca-se por sua capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico, tornando-a relevante na produção de biofertilizantes nitrogenados, contribuindo para a fertilidade do solo, o desenvolvimento de plantas e o potencial de produção de gás hidrogênio em ambientes desprovidos de N₂ (TARENTO *et al.*, 2018; QIU *et al.*, 2019).

Essas cianobactérias, procariontes fotossintetizantes sem membranas celulares especializadas, organizam-se em filamentos multicelulares compostos por células cilíndricas. Cepas específicas, como a *Anabaena cylindrica*, apresentam células especializadas chamadas heterocistos, responsáveis pela fixação do nitrogênio atmosférico, desempenhando um papel essencial na conversão do nitrogênio gasoso em amônia, beneficiando tanto as próprias cianobactérias quanto outros organismos aquáticos (QIU *et al.*, 2020).

Comumente encontrada em ambientes aquáticos, como lagos e rios, a *Anabaena cylindrica* desempenha papel importante na produção primária e no ciclo de nutrientes desses ecossistemas. Entretanto, determinadas cepas dessas cianobactérias podem produzir toxinas, como microcistina, apresentando riscos potenciais à saúde humana, animal e ambiental. Tais toxinas são liberadas durante o ciclo de vida celular ou em ambientes desfavoráveis ao crescimento destas cianobactérias (FATHABAD *et al.*, 2019).

3.6.6.2. *Nannochloropsis* sp.

As microalgas do gênero *Nannochloropsis* sp. também são amplamente conhecidas por sua biomassa extremamente rica, por sua alta capacidade reprodutiva e sua resistência a condições ambientais adversárias o que as torna interessantes para a indústria de combustíveis renováveis (ZANELLA; VIANELLO, 2020). No que tange às suas propriedades bioativas, sua biomassa é rica em substâncias como ácidos graxos insaturados, ácido eicosapentaenoico, ômega 3, vitamina E, vitamina D3 e carotenoides (MIENIS; VANDAMME; FOUBERT, 2023), além da presença de vitamina K1 (LUJBIC *et al.*, 2020).

Parte do grupo *Ochrophyta*, essa microalga apresenta uma coloração castanho-dourada devido à fucoxantina, pigmento presente nos plastídios secundários que contém clorofila a e c. Com seu formato esférico e tamanho médio de 2 a 3 µm, a *Nannochloropsis* é capaz de produzir biopigmentos de alta qualidade, como astaxantina, zeaxantina e cantaxantina, além de acumular ácidos graxos orgânicos poli-insaturados (VOLKMAN *et al.*, 2016)

Amplamente utilizada na aquicultura, a *Nannochloropsis* é empregada na larvicultura de peixes marinhos, no enriquecimento de rotíferos e até como alternativa à farinha de peixe em rações. A sua escolha deve ao rápido crescimento, resistência ao manejo e adaptabilidade a uma variedade de ambientes, incluindo variações de temperatura, salinidade e luminosidade (ERYALÇIN, 2019).

Seu cultivo em larga escala pode ser realizado com meios de cultura alternativos, como fertilizantes agrícolas ou efluentes de carcinicultura, mantendo níveis de produção de carotenoides equivalentes aos métodos tradicionais. Além de seu valor nutricional, as microalgas desse gênero são fontes importantes de ácidos graxos essenciais, como o ácido eicosapentaenoico e o ácido araquidônico, essenciais para o desenvolvimento de aquários, sendo nutrientes constituintes não produzidos de forma eficiente por esses organismos (BARTA; COMAN; VODNAR, 2021).

3.6.6.3. *Arthrospira platensis*

Arthrospira platensis, comumente conhecida como espirulina, é uma espécie de cianobactéria. É um organismo multicelular microscópico em forma de espiral que prospera em ambientes de água doce quentes e alcalinos. A espirulina é conhecida por seu rico conteúdo nutricional e tem sido consumida como fonte de alimento por séculos (DU *et al.*, 2021). Pertence à família Oscillatoriaceae, englobando um grupo de cianobactérias filamentosas comumente denominadas algas verdes-azuladas. Essas cianobactérias formam cadeias celulares em filamentos espiralados, denominados tricomas, compostos por células cilíndricas, curtas e largas, revestidas por membranas finas. O diâmetro das células varia entre 6 e 12 µm, enquanto as estruturas helicoidais formadas pelos filamentos podem apresentar diâmetros de 30 a 70 µm (IBRAHIM *et al.*, 2023).

Originalmente procedente de lagoas na África e na América tropical, a Spirulina demonstrou notável adaptabilidade, crescendo em ambientes ricos em sais minerais com pH entre 8 e 11, até mesmo em locais extremos como desertos, vulcões e na Antártida. Sua capacidade de reprodução rápida e realização de fotossíntese oxigênica atrativa para a produção de biomassa rica em compostos biologicamente ativos (AMPOFO; ABBEY, 2022).

Os sistemas de cultivo da Spirulina podem ser abertos ou fechados, sendo o método "race-way" ou mais comum em nível industrial, dependendo da luz solar como fonte primária de energia. A aeração e a melhoria são essenciais para evitar limitações no crescimento devido à fotoinibição (DE OLIVEIRA FERNANDES; CAMARGO-SANTOS; & ZORZAL-ALMEIDA, 2022). Essas cianobactérias são reconhecidas por seu alto teor proteico, variando entre 60-70%, sendo utilizadas na nutrição animal e humana. A produção de Spirulina ocorre

mundialmente, destacando-se Estados Unidos, Japão, Israel e Austrália como principais produtores (SONI *et al.*, 2021).

Além de sua função nutricional, a Spirulina despertou interesse por seus benefícios à saúde e aplicações na indústria farmacêutica. Estudos científicos respaldam sua classificação como "Generally Recognized As Safe" (GRAS) pelo FDA, garantindo seu uso seguro na alimentação humana e animal (FAIS *et al.*, 2022). A Spirulina possui propriedades terapêuticas relacionadas a condições como diabetes, artrite, doenças cardiovasculares, entre outras. Estudos também destacam sua atividade antimicrobiana, evidenciando a inibição do crescimento de microrganismos Gram-positivos, como *S. aureus* (SONI *et al.*, 2021; HASSAN *et al.*, 2022).

A Spirulina possui uma biomassa rica em macro e micronutrientes, dentre os macronutrientes podem ser citados: Proteínas, Carboidratos, Fibras alimentares, Cinzas e Lipídeos. Quanto aos micronutrientes presentes em sua biomassa, podem ser encontrados Potássio, Magnésio, Cálcio, Sódio, Ferro, Zinco, β -caroteno, Filoquinona (K1), Riboflavina (B2), Tiamina (B1), Cobalamina (B12), Biotina. Sendo considerada uma fonte importante de K1, esta cianobactéria possui em sua composição cerca de 0,3 μ g/g de biomassa seca, um valor ainda maior que as maiores fontes alimentares conhecidas (espinafre e couve) (NOURI *et al.*, 2018; TARENTO *et al.*, 2018).

Dessa maneira, essa cianobactéria é considerada um recurso natural valioso, uma vez que seus compostos fenólicos também possuem propriedades antioxidantes. No cenário brasileiro, a Spirulina é contemporânea como um novo ingrediente alimentar, com recomendação de ingestão diária não superior a 1,6 g. Sua presença em produtos farmacêuticos e alimentares, comercializados como alimentos funcionais, nutracêuticos ou suplementos alimentares, evidencia seu amplo espectro de aplicação (ALFADHLY *et al.*, 2022).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Neste estudo foram utilizadas três tipos de biomassas. Destas, duas são provenientes de cianobactérias, sendo uma cultivada em laboratório sob condições artificiais. A primeira corresponde à cepa *Anabaena cylindrica* (PCC7120) do Instituto Pasteur, que foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas (LCF) da Universidade Federal do Rio Grande e foi cultivada de acordo com método adaptado (JACINAVICIUS; GAMA-JÚNIOR; AZEVEDO; SANTANNA, 2013). A segunda cianobactéria é de origem comercial e foi adquirida em forma de pó, por meio de compra em farmácia magistral (22E02-B003-91968, Infinity Pharma). A terceira amostra corresponde à *Nannochloropsis sp.*, uma microalga isolada do manguezal da região metropolitana de Aracaju por técnica de diluição seriada e cultivada em fotobiorreatores pelo Laboratório de Cromatografia Gasosa e Bidimensional do Instituto de Tecnologia e Pesquisa.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 CULTIVO DA *Anabaena cylindrica*

A cepa da cianobactéria *A. cylindrica* foi cultivada em meio de cultura BG-11 preparado com algumas adaptações (JACINAVICIUS; GAMA-JÚNIOR; AZEVEDO; SANTANNA, 2013). Para o experimento, foi utilizada uma amostra de 10 mL da cepa da cianobactéria *Anabaena cylindrica* cedida pelo Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas (LCF) da Universidade Federal do Rio Grande.

O meio de cultura foi preparado a partir de soluções aquosas de acordo com a composição apresentada no quadro 2. Cada componente foi pesado e dissolvido separadamente em 50 mL de água destilada. Após total dissolução, as soluções foram misturadas na ordem em que se apresentam no quadro 2, obtendo assim 450 mL de meio de cultura concentrado (solução estoque).

Quadro 2- Composição do meio de cultura concentrado (solução estoque)

Ordem de adição dos componentes	NUTRIENTES	Quantidade (g)	Volume de água destilada (mL)
1	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	0,005	50
2	Citrato férrico amoniacal (C ₆ H ₈ O ₇ x Fe ³⁺ . yNH ₃)	0,03	50
3	Solução de metais traços	(quadro 03)	50
4	Nitrato de sódio (NaNO ₃)	7,500	50
5	Fosfato ácido dipotássio trihidratado (K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O)	0,2	50
6	Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ . 7H ₂ O)	0,375	50
7	Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl ₂ . 2H ₂ O)	0,18	50
8	Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	0,1	50
9	Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ . H ₂ O)	0,03	50
Volume total			450

A solução de metais traços foi preparada dissolvendo todos os componentes descritos no quadro 3 em 50 mL de água destilada, em seguida, esta solução de metais traços de 50 mL foi incorporada no meio concentrado. O meio de cultura preparado foi homogeneizado por agitação magnética. A solução apresentou pH de 6,93. O meio concentrado foi armazenado em frasco plástico no freezer a -15°C, até o momento de uso.

Quadro 3- Composição da solução de metais traços

COMPONENTES	Quantidade (g)
H ₃ BO ₃	0,143
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,090
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,011
NaMoO ₄	0,015
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,003
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,002
Água destilada q.s.p	50 mL

No momento da utilização, o meio concentrado foi descongelado e diluído em água destilada na proporção 4:50 (meio concentrado:água destilada). Após essa diluição, o meio foi esterilizado em autoclave vertical a 120° C por 30 minutos e resfriado em capela de fluxo laminar sob luz UV. Em seguida, procedeu-se à inoculação da cianobactéria.

As culturas foram mantidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, vedados e sem aeração. No laboratório de cultivo, as culturas incubadas foram monitoradas diariamente com temperatura controlada (23-25°C), mantendo ciclos diários de 12h de claro/escuro. Quanto à iluminação, os frascos Erlenmeyer contendo as cepas em meio de cultivo foram posicionados abaixo de duas lâmpadas de LED de 9w, fornecendo luz branca e fria.

Os repiques foram realizados a cada trinta dias, utilizando 5 mL de células em 54 mL de meio. Esse processo permitiu que o estudo e o acompanhamento da *A. cylindrica* fossem conduzidos periodicamente a fim de identificar o crescimento regular da biomassa, sendo este, documentado por registros fotográficos a cada 30 dias.

4.2.2 Caracterização das biomassas

As biomassas das três fontes de vitamina K selecionadas neste trabalho (espirulina, *Anabaena cylindrica* e *Nannochloropsis* sp) foram avaliadas em relação ao seu conteúdo de ficocianina, clorofila a e b e carotenoides.

4.2.2.1. Determinação de ficocianinas (fração aquosa)

Para recuperação da ficocianina presente na biomassa, as amostras foram introduzidas em 12,5 mL de solução tampão fosfato pH 7,4. A suspensão foi tratada por sonicação por 20 min em banho de ultrassom (Branson 1510). Após centrifugação por 10 min a 4.000 rpm (Hettlic Routine 380). A densidade óptica do sobrenadante foi medida em um leitor de microplacas (**Epoch™** - Biotek) em 612, 652 e 562 nm. As concentrações dos derivados de ficocianina foram determinadas usando as fórmulas do método Bennett e Bogorad (equações 1 a 3). Os resultados foram expressos em mg·L⁻¹ (Bennett e Bogorad, 1973): A concentração total de ficocianina = ficocianina (c-PC) + concentração de alocianina (APC) + ficoeritrina (PE).

$$[c - PC] = (DO^{615} - 0,474 \times DO^{652}) \div 5,34 \quad (1)$$

$$[APC] = (DO^{652} - 0,208 \times DO^{615}) \div 5,09 \quad (2)$$

$$[PE] = (OD^{552} - 2,41 (PC) - 0,849 (APC) \div 9,62 \quad (3)$$

4.2.2.2. Determinação de carotenóides e clorofilas a e b (fração lipídica)

Após a recuperação de ficocianinas, a amostra sólida resultante foi congelada e liofilizada para determinação de clorofilas a e b e carotenoides totais, realizada em conjunto, seguindo a metodologia proposta por Lichtenthaler e Buschmann (2001). Foram pesados 0,010 g da amostra liofilizada em balança analítica (Shimadzu AUY220) e solubilizados em 5 mL de acetona 80% (v/v). A mistura foi homogeneizada (KASVI K40-1010) e depois centrifugada (Hettich Zentrifugen Rotina 380 R) a 4000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi separado e novo volume de acetona adicionado para nova centrifugação. O segundo sobrenadante foi misturado ao primeiro e submetido a leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda 470, 750, 664, 647 and 630 nm. Os rendimentos de pigmentos foram expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e determinados pelas equações 4 e 5. A concentração de carotenoides totais foi calculada de acordo com a equação 6 (Lichtenthaler and Buschmann, 2001):

$$Ca = 11,85 \times E^{664} - 1,54 \times E^{647} - 0,08 \times E^{630} \quad (4)$$

$$Cb = -5,43 \times E^{664} + 21,03 \times E^{647} - 2,66 \times E^{630} \quad (5)$$

$$C(x + c) = (1000 \times DO^{470} - 1.82 \times Ca - 85.02Cb)/198 \quad (6)$$

Onde:

Ca corresponde a Clorofila a

Cb corresponde a Clorofila b

C: carotenóide total

4.2.3 Obtenção e caracterização dos extratos para identificação da vitamina K1

O extrato foi obtido por saponificação. Misturou-se 1 g de amostra, 4 mL de etanol 99,5%, 0,01 g de Butilhidroxitolueno e 0,01 g de ácido ascórbico (antioxidante) em um tubo de ensaio. A mistura foi agitada em vórtex (KASVI K40-1010) por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de Ácido Etilenodiamino Tetra-acético saturado e 0,5 mL de KOH (50%) ao tubo. O tubo foi tampado, agitado e colocado em banho-maria fervente por 20 min, sendo novamente agitado após 10 min. O tubo foi então resfriado em banho de gelo por 10 minutos. Após a saponificação, adicionaram-se 2 mL de água e 2 mL de n-hexano:acetato de etila (8:2, v/v) para extração das vitaminas lipossolúveis. O tubo foi agitado por 10 min antes da

separação das camadas. A extração foi repetida com mais 2 mL de n-hexano:acetato de etila (8:2 v/v).

O solvente da mistura da camada orgânica foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em 1 ml de n-hexano, posteriormente foi filtrado com filtro de membrana PTFE 0,22 µm (Millipore-HVHP, MA, EUA), antes de submeter a amostra a análise cromatográfica.

A análise utilizou um cromatógrafo líquido Shimadzu®, equipado com um desgaseificador DGU-20A3, um auto injetor SIL-20A, duas bombas (A e B) LC 20AD, detector de arranjo de diodos a SPD-M20 (DAD) com uma interface CBM20A. Uma alíquota de 20 µL dos extratos foi injetada e foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex C18 de fase reversa de 150 x 4,6 mm (5 µm), em uma temperatura de forno de 35°C. A determinação foi realizada com uma fase móvel constituída de água ultrapura 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila (B) ambos desgaseificados em um fluxo constante (0,7 mL/min) e em modo isocrático de (30:70 v/v) A:B. O cromatograma obtido foi analisado em um comprimento de onda de 280 nm. Na ausência de um padrão cromatográfico para identificação e quantificação, foi utilizada uma amostra de vitamina K comercial (Infinity Pharma)

4.3. Desenvolvimento da formulação preparada com espirulina

A formulação de esponjas contendo a espirulina foi preparada a partir da metodologia descrita por DAI *et al.* (2009). Inicialmente, uma dispersão de quitosana a 2% (m/v) foi preparada em solução aquosa de ácido acético 1% em temperatura ambiente. Em outro béquer, uma dispersão de alginato a 2% foi preparada utilizando água destilada. As soluções foram agitadas separadamente por 24 h até total homogeneização. Após esse período, as dispersões foram vertidas em placas de 24 poços conforme volumes descritos no quadro 4. O material foi congelado no freezer por 72 h. O material congelado foi liofilizado (modelo L101, marca LIOTOP, bomba Agilent/Technologies) para obtenção das esponjas. A biomassa da espirulina em pó foi incorporada nas dispersões de alginato e quitosana a 2% para a obtenção de diferentes esponjas. Foram adicionadas nessas dispersões 0,4 mg de espirulina totalizando 2% de espirulina nas dispersões.

Quadro 4. Formulações para preparação da esponja contendo espirulina

Esponjas	Solução de alginato 2% (mL)	Solução de quitosana 2% (mL)	Concentração de espirulina na solução (mg/mL)	Espirulina (% final na esponja)
E-A:Q	1,0	1,0	-	-
E-AEsp:Q	1,0	1,0	0,4	2
E-A:QEsp	1,0	1,0	0,4	2
E-Q	-	2,0	-	-
E-QEsp	-	2,0	0,4	2
E-A	2,0	-	-	-
E-AEsp	2,0	-	0,4	2

E-A: esponja de alginato; E-Q: esponja de quitosana; E-AQ: esponja de alginato:quitosana; E-AEsp: esponja de alginato contendo espirulina; E-AEspQ: esponja de alginato contendo espirulina:quitosana; E-QEsp: esponja de quitosana contendo espirulina; E-AQEsp: esponja de alginato:quitosana contendo espirulina.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS ESPONJAS

4.4.1 Análise macroscópica das esponjas

As esponjas foram submetidas às análises macroscópicas para análise da coloração, homogeneidade, maneabilidade e porosidade (LOCILENTO, 2012). Esta análise foi obtida por meio de avaliação macroscópica, atribuindo escores de acordo com o aspecto das esponjas: (-) deficiente, (+) boa, (+++) excelente, conforme critérios descritos no quadro 5.

Quadro 5. Características macroscópicas das esponjas produzidas

Características	(-) Deficiente	(+) Boa	(+++) Excelente
Coloração	Sem uniformidade	Parcialmente uniforme	Totalmente uniforme
Homogeneidade	Separação total dos polímeros	Homogeneidade parcial dos polímeros	Homogeneidade total dos polímeros
Manuseabilidade	Fragmentação do polímero durante manuseio, friável	Possibilidade de ser manuseado, porém com riscos de fragmentação	Possibilidade de ser manuseado sem risco de fragmentação
Porosidade	Poroso, com poros fragmentados	Poroso, com poros bem definidos	Denso, com baixa porosidade
Incorporação	Não incorporou a biomassa	Incorporou parcialmente a biomassa	Incorporou totalmente a biomassa

4.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As medidas foram feitas em um espectrofotômetro modelo Agilent Cary 630 FTIR, utilizando o método de transmissão na faixa de número de onda de 400 a 4000 cm⁻¹ com 32 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹.

4.4.3. Análise de intumescimento

A análise de intumescimento foi realizada de acordo com metodologia descrita por MOHAMED; HAIDER; ALI (2011) com modificações. Amostras das esponjas com 2 cm de diâmetro foram pesadas e imersas em 30 mL de solução tampão de fosfato (pH 6,8) à 37 °C. As amostras foram retiradas em intervalos de 2 h (tempos 0, 2, 4 e 6 h) e então pesadas. O grau de intumescimento (%) será determinado de acordo com a Equação 7:

$$GI = \frac{m_f - m_i}{m_f} \times 100 \quad (7)$$

Na qual: GI = grau de intumescimento (%), mi= massa inicial da amostra (g), mf = massa úmida nos diferentes tempos da amostra (g).

4.4.4 Análise Térmica

4.4.4.1 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As propriedades térmicas das esponjas foram avaliadas por calorimetria diferencial de varredura, utilizando o DSC Q20 (TA Instruments). Amostras de aproximadamente 10 mg serão pesadas e armazenadas em recipiente hermético, onde serão aquecidas de 50 à 450 °C, seguindo 10 °C/min em atmosfera inerte de 50 mL/min de N₂.

4.4.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica das amostras foi realizada usando atmosfera de ar em um STA 7200 RV, Thermal Analysis System, (Hitachi High Technologies). As amostras foram aquecidas de 20°C a 450°C em uma taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹.

4.4.5 Teste mecânico

A resistência mecânica das esponjas (n=10) foi testada em um texturômetro (TAXT - Texture Analyzer Equipment), equipamento com célula de carga de 5 Kg (Stable Micro Systems). A fim de avaliar a relação tensão/deformação, a deformação e a velocidade de compressão foram fixadas em 50% e 1 mm/min, respectivamente. A tensão de compressão máxima foi obtida a partir da curva tensão-deformação. O experimento consistiu em colocar a esponja sob uma sonda de 36 mm de diâmetro e comprimi-la a uma distância de 4 mm a uma velocidade de teste de 0,5 mm s.

4.5 Ensaio de Coagulação

Aspectos éticos:

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tiradentes (UNIT) e aprovado com parecer nº020123RA conforme anexo 1. Os experimentos com animais foram realizados no Biotério da Universidade Tiradentes (UNIT).

Para execução dos testes que envolvam amostras coletadas de animais, foram seguidos os princípios éticos da experimentação animal de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2009) seguidas as normas para a prática didático-científica de acordo com a Lei nº 9.605/1998, §1º e o Projeto de Lei nº 1.691, de 2003, que dispõe sobre o uso de animais para fins científicos e didáticos.

A capacidade pró-coagulante das esponjas foi avaliada por meio da medição do índice de coagulação sanguínea (BCI) (ZHANG *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019). As amostras foram colocadas em tubos e após o aquecimento por 10 min a 37 °C, 50 µL de sangue de ratos em tubo com citrato de ratos foi colocada em suas superfícies superiores. Após incubação por 5 e 10 min a 37°C, 3 mL de água deionizada foram adicionados em cada tubo, e o valor da densidade óptica a 540 nm (OD 540 nm) do sobrenadante foi determinado usando um leitor de microplacas (BIO- RAD, iMARK™) e chamado como ODhemostático. A solução mista água/sangue em citrato (3 mL/50 µL) foi usada como controle negativo e sua DO 540 nm valor foi usado como um valor de referência (valor de referência OD). O BCI foi calculado com base na seguinte equação:

$$BCI (\%) = \frac{OD_{hemostat}}{OD_{reference\ value}} \times 100\%$$

4.6 Análise estatística

Os dados obtidos para todos os experimentos conduzidos foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para avaliação de normalidade de distribuição e homocedasticidade, respectivamente. Dados paramétricos foram comparados por meio do teste de Análise de variância (ANOVA), seguido do teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Tukey. Dados não paramétricos foram comparados utilizando teste de Kruskal – Wallis com pós teste Dunn. Em todos os testes utilizados foi adotado o nível de significância de 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CIANOACTÉRIAS

5.1.1 Cultivo da *A. cylindrica*

A biomassa de *A. cylindrica* foi avaliada macroscopicamente por registro fotográfico em até três momentos distintos: no início (tempo 0), após 30 dias e, finalmente, aos 60 dias, conforme indicado na Figura 5. Utilizando o meio de cultura BG11 e um ciclo de luz de 12 horas por dia, observou-se um aumento progressivo na biomassa presente nos meios de cultura, por meio da avaliação dos registros fotográficos ao longo do tempo.

A análise dos registros fotográficos revelou que o crescimento da biomassa foi constante, com um incremento gradual ao longo dos dias. Evidentemente, foi necessário um período de 60 dias para alcançar o maior rendimento de biomassa. Isso sugere que o ciclo de crescimento da *A. cylindrica*, sob as condições experimentais estabelecidas, demanda tempo prolongado para atingir seu pico de produção.

Segundo Tarento *et al.* (2018) apud Hihara *et al.* (1998) e Anderson, Chow e Park (1995) que verificaram a intensidade da luz na produção de vitamina k1 utilizando o meio de cultivo MLA. O aumento da intensidade da luz pode levar a uma diminuição na concentração específica de filoquinona pelo fato da luz interferir nos fotossistemas I e II e consequentemente, na produção de clorofila. Entretanto, os resultados encontrados por Tarento *et al.* (2018) identificaram ainda, que maiores intensidades de luz podem provocar aumento da biomassa e consequentemente, do teor de filoquinona, divergindo dos autores anteriormente citados.

Segundo Kharwar, Bhattacharjee e Mishra (2021), o máximo crescimento de AC foi alcançado em meio de crescimento BG-11 com adição de sulfato de magnésio de 300 μ M (concentração padrão). Por outro lado, baixas concentrações de sulfato no meio de cultura, revelaram redução no crescimento, no teor de pigmentos fotossintéticos e de rendimento

quântico, além de danificar o fotossistema II, as membranas plasmáticas e tilacóide, podendo resultar em morte celular.

A respeito do ciclo diário, a literatura traz que maiores tempos de incidência e intensidade luz (24h) estavam associados à aumento na produção de biomassa e de filoquinona, bem como de esgotamento dos níveis de nitrato no meio líquido. Além disso, o fotoperíodo de 24h acabava afetando negativamente, em resposta a isso, as cores das células mudavam de verde-azulado para amarelo, potencialmente como uma resposta protetora a altos níveis prejudiciais de irradiância (TARENTO *et al.*, 2019).

Métodos analíticos de crescimento celular podem contribuir para o escalonamento da produção de biomassa de microalgas e cianobactérias, além de identificar o potencial de crescimento de cada cepa em relação as condições de cultivo determinadas (VEERABADHRAN *et al.*, 2021). De acordo com Kaur *et al.* (2021), a cepa PCC7120 da *Anabaena cylindrica* atinge crescimento máximo até o 16º dia de cultivo em meio BG-11, ficando estagnada após esse período.

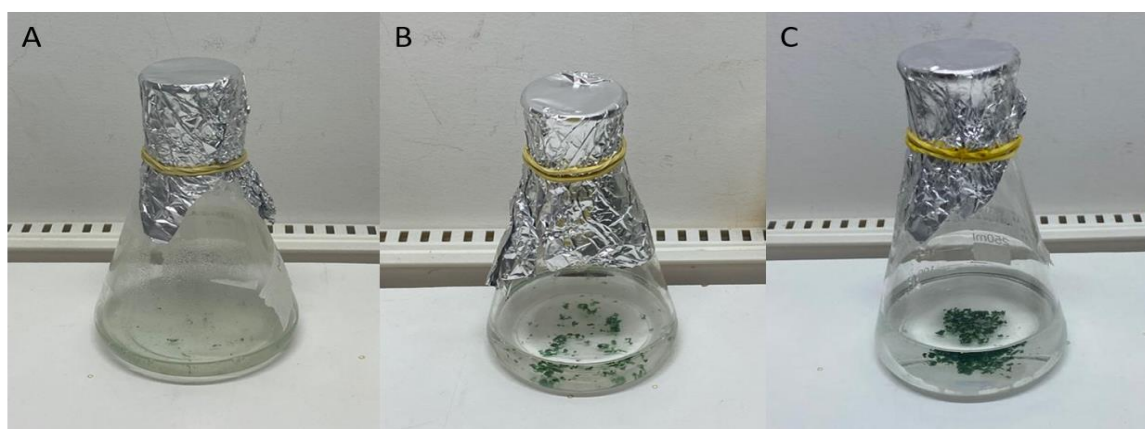


Figura 5. Cultivo da cepa *A. cylindrica* no meio BG-11. A: Tempo 0; B: 30 dias de cultivo; C: 60 dias de cultivo.

Macário *et al.* (2023) compararam o crescimento das cianobactérias *Anabaena cylindrica*, *Arthrospira platensis* e *Nostoc muscorum* durante 112 dias em fotobiorreatores de fotoperíodo 16/08h claro/escuro. Os autores observaram que a espirulina foi a cepa que apresentou maior rendimento de biomassa que as demais, e ainda, a que apresentou células mais saudáveis. Enquanto ESP apresentou um tempo de duplicação de 5,57 dias, permitindo atingir o maior valor de crescimento máximo das três espécies, AC apresentou o maior aumento na biomassa durante os primeiros 20 dias; mas depois disso o crescimento desacelerou e a espécie registrou os menores valores de crescimento máximo.

Conforme evidenciado por Mahdi *et al.* (2022), a avaliação da densidade ótica e a contagem celular revelaram que a espirulina produziu uma quantidade significativamente maior de biomassa em comparação com outras algas, nomeadamente "Chlorella" e

"Nannochloropsis", durante o mesmo período de cultivo. Surpreendentemente, embora a espirulina tenha apresentado um número menor de células ao longo do tempo, essa aparente disparidade pode ser explicada pela sua densidade celular superior. Apesar do menor número de células, a espirulina ainda exibe uma densidade ótica superior em comparação com as demais.

Dessa maneira, sendo ESP um micro-organismo que apresenta melhor escalabilidade de cultivo, conforme demonstrado na literatura, bem como melhores resultados no que tange à quantidade de crescimento de biomassa e qualidade das células formadas, baixo custo de produção e de aquisição a mesma foi selecionada para compor as esponjas poliméricas desenvolvidas.

5.1.2 Determinação de ficocianinas totais

Neste estudo, as concentrações de ficocianina, clorofila a e b e carotenoides totais foram investigadas em três micro-organismos distintos (AC; ESP; NS).

Ficocianinas, comumente conhecidas como ficobiliproteínas, são proteínas hidrossolúveis de tom azulado presentes em cianobactérias. A principal função destas moléculas está relacionada à captura da luz solar para realização da fotossíntese, auxiliando secundariamente as clorofilas na obtenção luz (SINTRA *et al.*, 2021).

O potencial anti-inflamatório, antioxidante e antitumoral destas proteínas contribuem para o aumento da busca da indústria farmacêutica e alimentícia por fontes naturais que a produzam (ESTRADA; BÉSCOS; DEL FRESNO, 2001; CHITTAPUN *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2023).

Segundo Dev *et al.* (2020) este pigmento pode estimular a cicatrização de feridas, cujo processo inicial depende da formação de coágulos de sangue e fatores hemostáticos, por meio do mecanismo de ativação do plasminogênio do tipo Uroquinase (uPA). No estudo de Jensen *et al.* (2015) foi possível observar também, por meio de testes *in vitro* que a ficocianina embora não tenha afetado o tempo de coagulação, contribuiu para a formação de coágulos mais fortes.

No presente estudo, a concentração de ficocianina variou conforme a espécie analisada. A biomassa comercial de espirulina apresentou maiores quantidades de ficocianina $0,039 \pm 0,003$ mg/mL em relação às demais biomassas. AC apresentou $0,018 \pm 0,001$ mg/L e NS $0,017 \pm 0,002$ mg/L (figura 6).

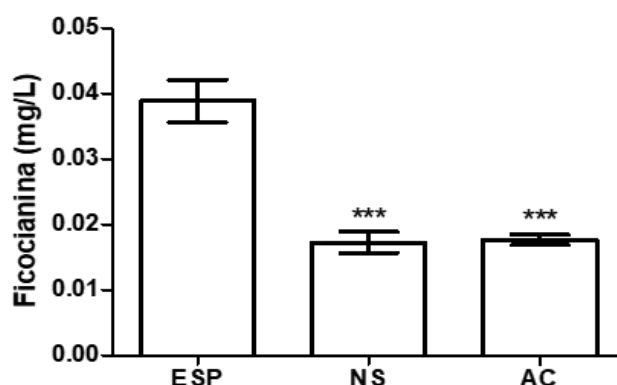


Figura 6. Determinação de ficocianina em AC, ESP e NS. Valores apresentados como média e desvio padrão. ANOVA seguido de Tukey – *** $p < 0,001$ (AC: *Anabaena cylindrica*; ESP: *Espirulina*; NS: *Nannochloropsis sp.*)

A quantidade de ficocianina presente na biomassa de espirulina difere das concentrações encontrada em Gorgich *et al.* (2020) e Berrouane *et al.* (2022).

De acordo com Tavanandi *et al.* (2018), a extração de ficocianina pode ser potencializada ao empregar outras técnicas associadas ao uso do ultrassom, como o método de congelamento e descongelamento, que apresentam maior eficiência e grau de pureza dentre as técnicas observadas. No estudo de Sintra *et al.* (2021), o método empregado para a extração de ficocianina em AC foi muito semelhante ao deste estudo, que utilizou a extração sequencial de ficocianina, clorofilas e carotenoides, respectivamente, diferindo apenas o uso de biomassa fresca, concentração molar do solvente, tempo e velocidade de centrifugação. Foi possível identificar ficocianina presente em AC.

A baixa concentração de ficocianina encontrada na biomassa de NS, por outro lado, pode estar associada à ausência desse pigmento na composição dessa microalga. Na pesquisa realizada por Santiago-Morales *et al.* (2018), não foi possível detectar a presença de ficocianina na biomassa de NS, fato que corrobora os achados deste trabalho.

5.1.3 Determinação de clorofilas a e b e carotenoides totais

A clorofila é um pigmento de cor esverdeada essencial para a fotossíntese e desempenha um papel importante na captura de luz solar para a produção de energia química. A concentração de clorofila nesses organismos é de grande importância, pois está diretamente relacionada à sua capacidade de produzir biomassa (OSÓRIO *et al.*, 2020).

As concentrações das clorofilas a e b nas diferentes biomassas estudadas estão apresentadas na figura 7.

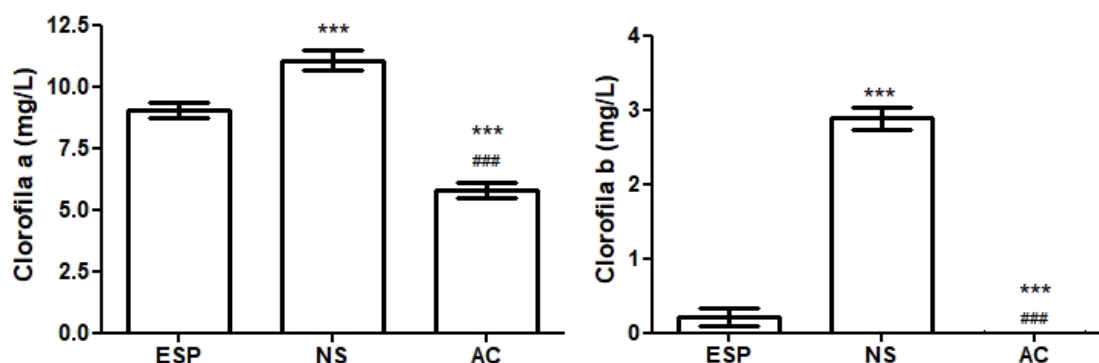


Figura 7. Determinação da quantidade de clorofilas em AC, ESP e NS. Valores apresentados como média e desvio padrão. ANOVA seguido de Tukey – ***p<0,001 em relação a ESP; ### p<0,001 em relação a NS (AC: *Anabaena cylindrica*; ESP: *Espirulina*; NS: *Nannochloropsis* sp.)

Após a análise estatística, os resultados demonstraram que a NS apresentou uma concentração média de clorofila “a” maior ($11,07 \pm 0,39$ mg/L) que as demais microalgas, enquanto a ESP mostrou uma concentração média de $9,07 \pm 0,31$ mg/L e a AC, uma concentração menor, sendo ela de $5,78 \pm 0,031$ mg/L.

No que se refere à concentração da clorofila “b”, observou-se um resultado semelhante às concentrações de clorofila a, sendo observada maior quantidade em NS $2,89 \pm 0,15$ mg/L, seguido da ESP $0,22 \pm 0,12$ com menor concentração e não sendo possível detectar presença de clorofila “b” em AC.

De acordo com Osório *et al.* (2020), uma das condições que podem ter influenciado no rendimento da extração e determinação das clorofilas de espirulina pode ser o uso da acetona, que embora seja um bom reagente para extrair as clorofilas e outras moléculas apolares de outras microalgas, não possui tanta afinidade com a estrutura molecular da espirulina. A utilização de acetona em concentrações maiores, ou mesmo de outros solventes, pode apresentar rendimentos melhores.

Os resultados encontrados no estudo de Rinawati, Sari e Pursetyo (2020), divergem dos achados deste estudo. Nele, os autores utilizam de um procedimento metodológico semelhante ao método de extração empregado neste, adicionando apenas o uso do aquecimento em banho-maria a 40°C após homogeneização da amostra. Entretanto, obtêm como resultado uma quantidade menor de clorofilas “a” (1,80 vs 11,07 mg/L) e “b” (0,78 vs 2,89 mg/L) na amostra de NS. Ademais, a cepa que apresentou maior quantidade de clorofilas foi a *Espirulina*, outro dado divergente aos achados deste estudo. O uso de temperatura pode ter influenciado na extração destes compostos.

Quanto à extração de clorofilas a partir da biomassa de AC, o estudo realizado por Sintra *et al.* (2021) determinou o teor de clorofilas após a extração de ficocianinas, característica semelhante à deste estudo, mas que se difere nos demais procedimentos metodológicos. Sendo assim, a ausência ou o baixo valor de clorofila “b” encontrados neste estudo a partir das biomassas de AC e ESP respectivamente, podem estar associados à não produção destes pigmentos por estes micro-organismos, corroborando os achados de Jones e Myers (1964).

A ausência de clorofila “b” pode ser explicada em AC pela existência de complexos de antenas presentes em membranas tilacoide, que auxiliam a clorofila “a” na captação de luz. Tais complexos são denominados ficobilissomos, que são estruturas formadas por diferentes ficobiliproteínas cromoforiladas, como a ficocianina analisada neste estudo (STRIETH *et al.*, 2020).

Carotenóides são substâncias químicas caracterizadas como pigmentos apolares de aspecto lipossolúvel presentes em alimentos, especialmente nos vegetais, frutas, legumes, bem como em micro-organismos como microalgas e cianobactérias, conferindo a estas colorações que podem expressar diferentes tonalidades (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2022). A presença e quantidade de carotenoide está, majoritariamente, relacionada à sua tonalidade, sendo diretamente proporcional, ou seja, quanto maior a tonalidade da planta/micro-organismo, maior a sua quantidade de carotenoide (LU *et al.*, 2021).

Tais substâncias são extremamente benéficas à saúde humana, tal afirmação pode ser sustentada com base na sua atividade antioxidante demonstrada na literatura (GHAFOOR *et al.*, 2020). Acredita-se que estas ainda atuem promovendo a síntese de substâncias orgânicas essenciais para o bom funcionamento do corpo humano, como por exemplo o retinol, mais conhecido como vitamina A (CARAZO *et al.*, 2021).

A quantidade de carotenoides presentes nas amostras foi determinada na microalga NS, a qual demonstrou quantidade maior de carotenoides ($1673,74 \pm 24,21 \mu\text{g/g}$) quando comparada às cianobactérias AC ($503,04 \pm 40,83 \mu\text{g/g}$) e ESP ($432,42 \pm 22,64 \mu\text{g/g}$) (figura 8).

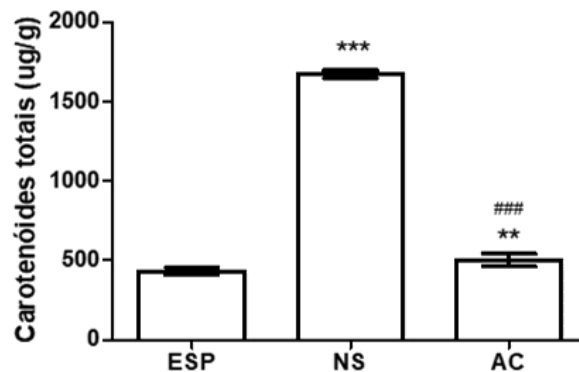


Figura 8. Determinação da quantidade de carotenoides em *Espirulina* (ESP), *Nannochloropsis* sp (NS) e *Anabaena cylindrica* (AC). Valores apresentados como média e desvio padrão. Anova seguido de Tukey – ***p<0,001 em relação a ESP; ### p<0,001 em relação a NS

Outrossim, Gruszecki e Strzałka (2005) trazem que estes pigmentos também são fundamentais para a vitalidade e homeostase dos alimentos e micro-organismos que os produzem, visto que, dentre as inúmeras funções, estes desempenham um papel essencial na estabilização das paredes celulares e atuam auxiliando as clorofilas na captação de luz solar para fotossíntese.

Em uma pesquisa realizada por Park *et al.* (2018), os conteúdos de carotenoides foram extraídos da biomassa de ESP usando solvente semelhante ao deste estudo, mas em condições metodológicas distintas. No estudo supracitado, o rendimento de carotenoide na espirulina de biomassa comercial (pó seco) foi menor do que o presente nas extrações de biomassa fresca secada por liofilização, o que pode ser resultante da degradação durante o processo de produção, resultado convergente ao deste estudo.

Masamoto e Furukawa *et al.* (1997) avaliaram o conteúdo de carotenoide presente em diversas cepas de cianobactérias do gênero *Anabaena* e conseguiram identificar direta proporcionalidade entre a intensidade da luz sobre a cepa e a produção de carotenoides. Dentre as cepas avaliadas no estudo referido, a AC esteve presente e apresentou aumento na produção de carotenoide conforme a intensidade da luz.

No estudo de Rinawati, Sari e Pursetyo (2020) que realizaram um comparativo sobre os pigmentos de clorofila e carotenoides encontrados na biomassa de algas de diferentes gêneros e espécies, incluindo NS e ESP, foi observado conteúdo de carotenoides em maior conteúdo em ESP do que em NS. Neste estudo, observou-se presença destes pigmentos ESP ($432,42 \pm 22,64 \mu\text{g/g}$) e NS ($1673,74 \pm 24,21 \mu\text{g/g}$).

5.1.4 Identificação da vitamina K1 das amostras

O extrato apolar de AC possui vitamina k1 em sua composição (Tarento *et al.*, 2018), assim como ESP (Nouri *et al.*, 2018) e o extrato apolar de NS, o qual foi estudado por Ljubic *et al.* (2021) que evidenciam a presença de 10 ng/g de vitamina K1.

A identificação de vitamina k1 das amostras foi realizada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e os resultados estão apresentados no cromatograma dispostos na Figura 9. A vitamina K1 foi identificada pela comparação do perfil cromatográfico dos extratos com a de uma substância comercial adquirida como vitamina K1. Embora não seja um padrão cromatográfico, pode-se sugerir a presença desta substância em todas as amostras, uma vez que todas apresentaram pico cromatográfico no tempo de retenção 27,2 min.

Embora os três micro-organismos possuam vitamina k1 em sua composição, ainda não foi possível quantificá-la, devido à ausência de padrão. As áreas dos picos cromatográficos relativos à vitamina k1 estão representadas na tabela 2 descrita abaixo e sugere uma maior concentração do composto na amostra de AC, uma vez que a área do pico é diretamente proporcional à concentração do composto.

Tabela 2. Áreas dos picos cromatográficos relativos à vitamina K1 de diferentes fontes

EXTRATOS	ÁREA	AC:
PADRÃO COMERCIAL (VITK1)	734,23	
AC	1981,10	
ESP	11,18	
NS	614,47	

Anabaena cylindrica; ESP: Espirulina; NS: *Nannochloropsis sp.*

Comparando-se as áreas do pico cromatográfico relativo à vitamina k1, o extrato apolar de AC apresentou concentrações maiores de vitamina k1, seguido pela NS. O extrato apolar de ESP foi o que apresentou menor concentração entre as fontes estudadas.

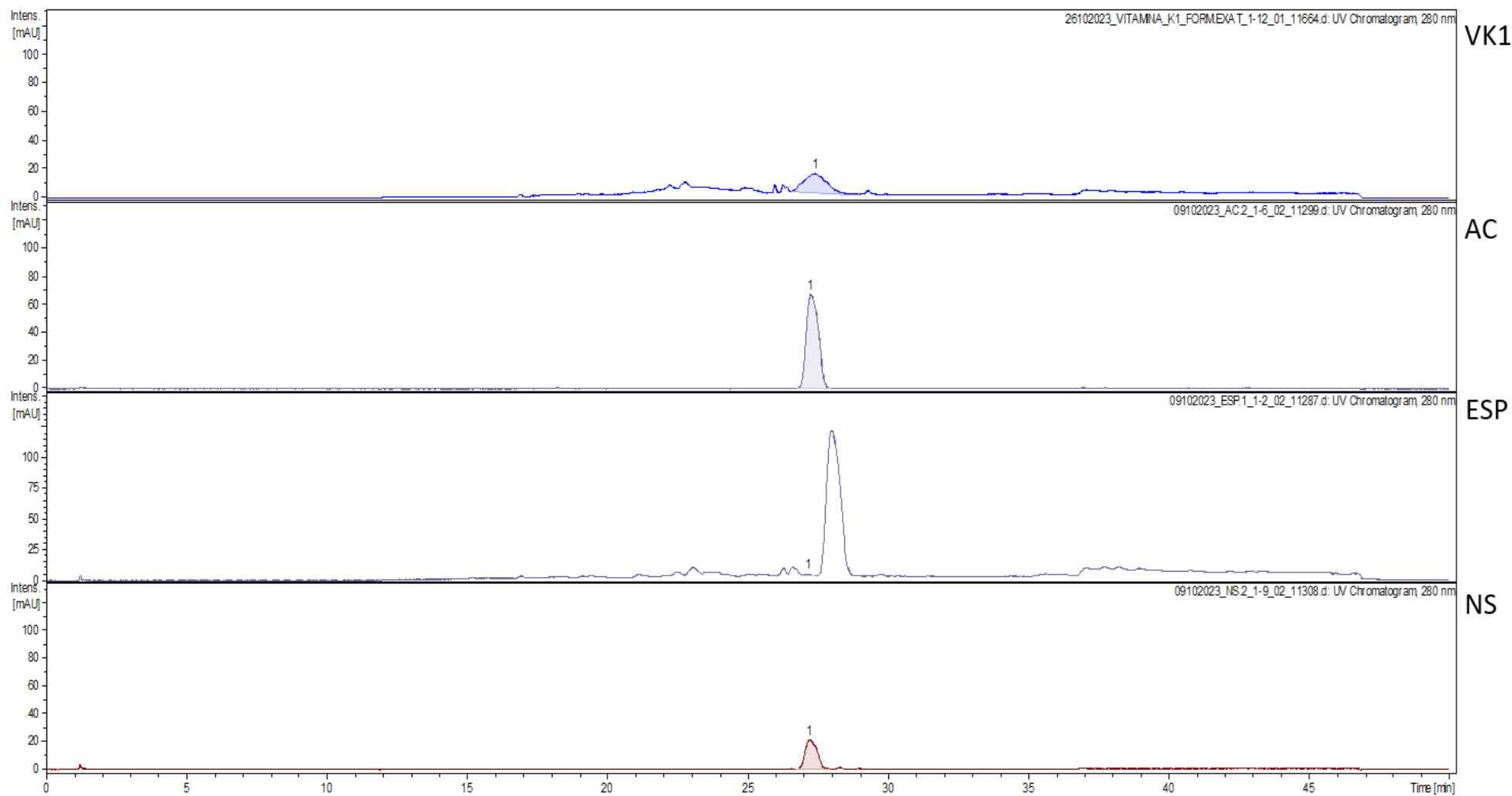


Figura 9. Análise cromatográfica. Identificação da vitamina K1 em AC = *Anabaena cylindrica*, tempo de retenção 27,2 min; ESP = *Espirulina*; NS = *Nannochloropsis* sp., comparando com material comercial (VK1)

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPONJAS

5.2.1 Desenvolvimento da formulação preparada com espirulina e análise macroscópica

Na Figura 10 foi apresentada a aparência macroscópica das diferentes esponjas desenvolvidas a partir de polissacarídeos alginato de sódio e quitosana, contendo ou não espirulina.

As esponjas construídas a partir de um polímero (E-A; E-AEsp; E-Q; E-QEsp) apresentaram homogeneidade no que se refere à seu aspecto morfológico. As demais esponjas construídas a partir da união dos polímeros de alginato e quitosana apresentaram duas fases (E-AQ; E-AEspQ; E-AQEsp).

Esponjas contendo alginato (E-A; E-AEsp; E-A:Q; E-AEspQ; E-AQEsp), independentemente da localização ou quantidade, apresentavam grande absorção de umidade quando submetidas ao ambiente, o que fazia com que as esponjas perdessem rigidez e diminuíssem de tamanho. Por outro lado, a quitosana quando incorporada na esponja, não apresentava tanta absorção de umidade e conseguia manter a integridade mesmo quando exposta ao ambiente. O desenvolvimento de esponjas mistas destes polímeros pode ser considerada uma alternativa viável, uma vez que combina as propriedades de ambos os polímeros.

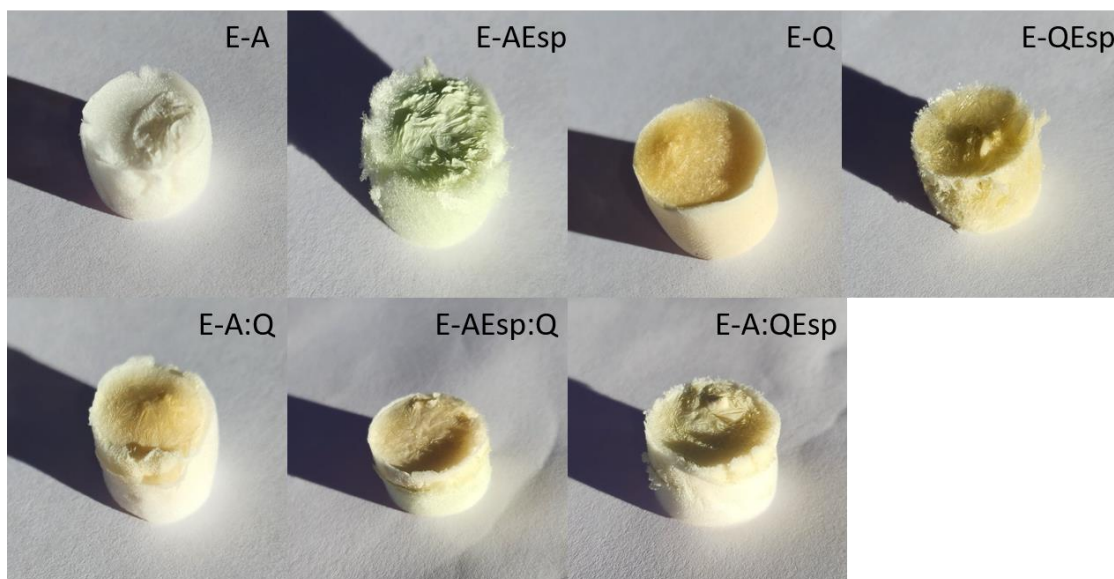


Figura 10. Aspectos macroscópicos das esponjas. E-A: Esponja de Alginato; E-AEsp: Esponja de Alginato com espirulina a 2%; E-Q: Esponja de Quitosana; E-QEsp: Esponja de Quitosana com espirulina a 2%; E-AQ: Esponja de Alginato e Quitosana; E-AEspQ: Esponja de Alginato + espirulina a 2% e Quitosana; E-AQEsp: Esponja de Alginato e Quitosana + espirulina a 2%.

A classificação das esponjas obtidas em relação à coloração, homogeneidade, manuseabilidade, porosidade e incorporação da espirulina.

Quadro 6. Escores atribuídos às esponjas em relação aos aspectos macroscópicos

Formulações	Coloração	Homogeneidade	Maneabilidade	Porosidade	Incorporação
E-A	+++	+++	+++	+	N.D
E-AEsp	+++	+++	+++	+	+++
E-Q	+++	+++	+++	+++	N.D
E-QEsp	+++	+++	+	-	+++
E-AQ	-	-	+	+++	N.D
E-AEspQ	-	-	-	+++	+++
E-AQEsp	-	-	+	+++	+++

ND: não se aplica

5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise FT-IR foi realizada para verificar as modificações dos grupos funcionais ocorridas nos polímeros que compõe as esponjas. A Figura 11 representa os grupos funcionais da quitosana e da espirulina e de esponjas contendo ou não a biomassa de cianobactéria.

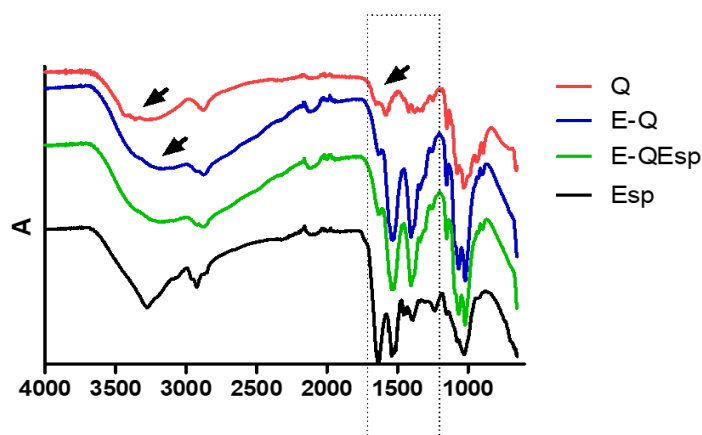


Figura 11. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Q: quitosana, E-Q: esponja de quitosana; E-QEsp: esponja de quitosana contendo espirulina; Esp: espirulina

Ao comparar as amostras Q (quitosana matéria-prima) e E-Q, observou-se que o processo de liofilização da dispersão de quitosana altera o perfil espectral da molécula, com deslocamento da banda na região entre 3000-3500 cm^{-1} , atribuídas a N-H ou O-H, além da diminuição e deslocamento da banda em 1700 cm^{-1} e aparecimento de banda dupla em 1550 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} referentes aos grupamentos amida I e amida II, respectivamente (DAI *et al.*,

2009; SERGEEVA *et al.*, 2023). Quando se compara o perfil espectral da esponja contendo apenas moléculas de quitosana (E-Q) com a esponja onde a espirulina foi incorporada (E-QEsp), observou-se alta similaridade das bandas, não apresentando qualquer alteração relevante (Figura 11).

Já nas amostras A e E-A, representadas pela Figura 12, foi possível observar que o processo de liofilização da dispersão de alginato não alterou o perfil espectral da molécula drasticamente, mantendo a banda na região entre 3.250 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento de O-H, e suas bandas características 1.417 cm^{-1} e 1.613 cm^{-1} (vibrações de estiramento simétricas e assimétricas de $-\text{COO}-$), corroborando os achados de Song *et al.* (2023) no que se refere ao perfil químico de esponjas de alginato. Foi observado apenas alteração na região de 1.033 cm^{-1} , possivelmente referente ao estiramento C-O formado após a liofilização (MA *et al.*, 2019).

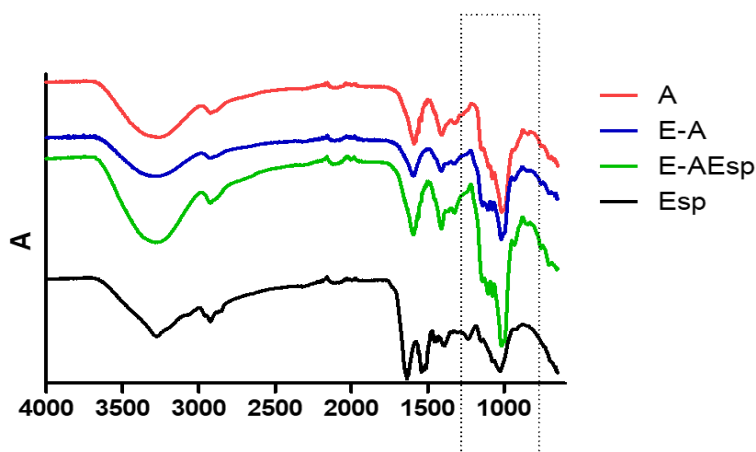


Figura 12. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. A:alginato, E-A: esponja de alginato; E-AEsp: esponja de alginato contendo espirulina; Esp: espirulina

O perfil espectral da esponja contendo apenas moléculas de alginato (E-A) comparado ao da esponja onde a espirulina foi incorporada (E-AEsp), apresentou aumento da intensidade das bandas, possivelmente pelo material apresentar polissacarídeos com perfil espectral semelhante. Neste contexto, no que se refere ao espectro da espirulina, as faixas de frequência na região de $3.500\text{--}3.200\text{ cm}^{-1}$ são indicativas da presença de vibrações de alongamento O-H, denotando a existência de álcoois e fenóis. Já as frequências de 3.000 a 2.850 cm^{-1} correspondem a picos que sinalizam a presença de vibrações de alongamento CH em alcenos. Na faixa de 3.300 a 2.500 cm^{-1} , os picos são característicos da vibração de alongamento alifático O-H em ácidos carboxílicos (LIU *et al.*, 2013).

Segundo Theivandran, Ibrahim e Murugan (2015), as frequências entre 2.260 e 2.100 cm^{-1} representam as vibrações de alongamento da ligação tripla $\text{C}\equiv\text{C}$ em alcinos. Os picos na faixa de $1.680\text{--}1.640\text{ cm}^{-1}$ indicam a presença da vibração de estiramento $\text{C}=\text{C}$ em alcenos. Na região de $1.550\text{--}1.475\text{ cm}^{-1}$, os picos estão associados à vibração de alongamento assimétrico N – O em nitro compostos.

As frequências específicas variam entre 1.320 e 1.000 cm^{-1} , abrangendo o alongamento C-O e as vibrações de flexão O-H em álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres e éteres. Na faixa de 1.300–1.150 cm^{-1} , os picos são característicos da vibração C – H em halogenetos de alquila. O pico a 1.250–1.020 cm^{-1} está relacionado ao alongamento C – N, indicando a presença de aminas alifáticas. Na região de 910–665 cm^{-1} , observou-se a vibração primária de alongamento simétrico NH em aminas secundárias (CASAZZA *et al.*, 2020).

Quando se observou as esponjas obtidas pela composição AQ, nota-se que os perfis espectrais são extremamente semelhantes a AQEsp e AEspQ, sugerindo que a adição de espirulina não alterou a interação entre os dois polissacarídeos. Esse achado também foi observado num estudo realizado por Barua *et al.* (2019) que produziu esponjas poliméricas de alginato e hidroxiapatita contendo biomassa de microalgas. Na análise dos grupos funcionais, não foi possível identificar nenhuma interação química relevante orgânica das microalgas nas esponjas produzidas (Figura 13).

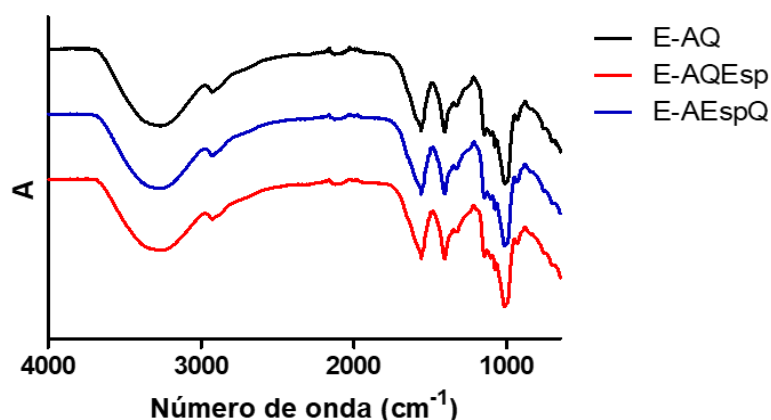


Figura 13. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. E-AQ: esponjas de alginato e quitosana, E-AEsp:Q: esponja de alginato contendo espirulina:quitosana; E-A:QEsp: esponja de alginato:quitosana contendo espirulina.

Após análise dos espectros de FTIR foi observada forte interação entre os grupos funcionais do alginato e de moléculas contidas na biomassa de espirulina nas formulações E-AEsp, o que não ocorre E-QEsp. Além disso, as bandas espectrais de E-AQ quando comparadas com as bandas de E-AQEsp e E-AEspQ apresentaram-se semelhantes, sugerindo que a interação entre os grupos funcionais da biomassa e os polímeros não é relevante, sendo as interações entre os dois polímeros prevalentes.

5.2.3 Análise de intumescimento

O teste de intumescimento contribui para avaliar o potencial de inchaço e absorção de fluidos de um produto. Assim, quanto maior esse potencial em um produto hemostático, melhor, sendo esta, uma caracterização indispensável.

Após 2 horas em contato com a solução aquosa de tampão fosfato, a esponja de alginato (E-A) dissolveu totalmente. A inclusão de espirulina em esponjas de alginato (E-AEsp) não alterou esta característica, também se dissolvendo nas primeiras horas do experimento.

Todos as demais esponjas apresentaram intumescimento superior a 430% sem diferença estatística em relação ao comportamento das esponjas de quitosana (E-Q). A inclusão de espirulina nas esponjas contendo quitosana (E-QEsp, E-AEspQ e E-AQEsp) apresentaram comportamento semelhante entre si, independente do modo de preparado (adição de espirulina na dispersão de quitosana ou de alginato).

O comportamento de intumescimento das amostras estudadas foi semelhante ao encontrado no estudo realizado por Yanovska *et al.* (2021), que identificou que esponjas de alginato absorveram água mais rápido que as demais e se dissolveu em menos de 2h. A adição de quitosana às esponjas de alginato alterou a capacidade de absorção e dissolução das esponjas.

Todos as esponjas contendo quitosana permaneceram intumescidas, porém demonstraram diminuição no percentual de intumescimento (entre 282 e 426%). Esta perda é provavelmente relativa à dissolução de parte das esponjas. As esponjas obtidas com a mistura E-AQ, contendo espirulina apresentaram intumescimento menor em relação ao controle E-Q. Esponjas de E-QEsp apresentam intumescimento estatisticamente igual a E-Q. A Figura 14 ilustra os resultados supracitados.

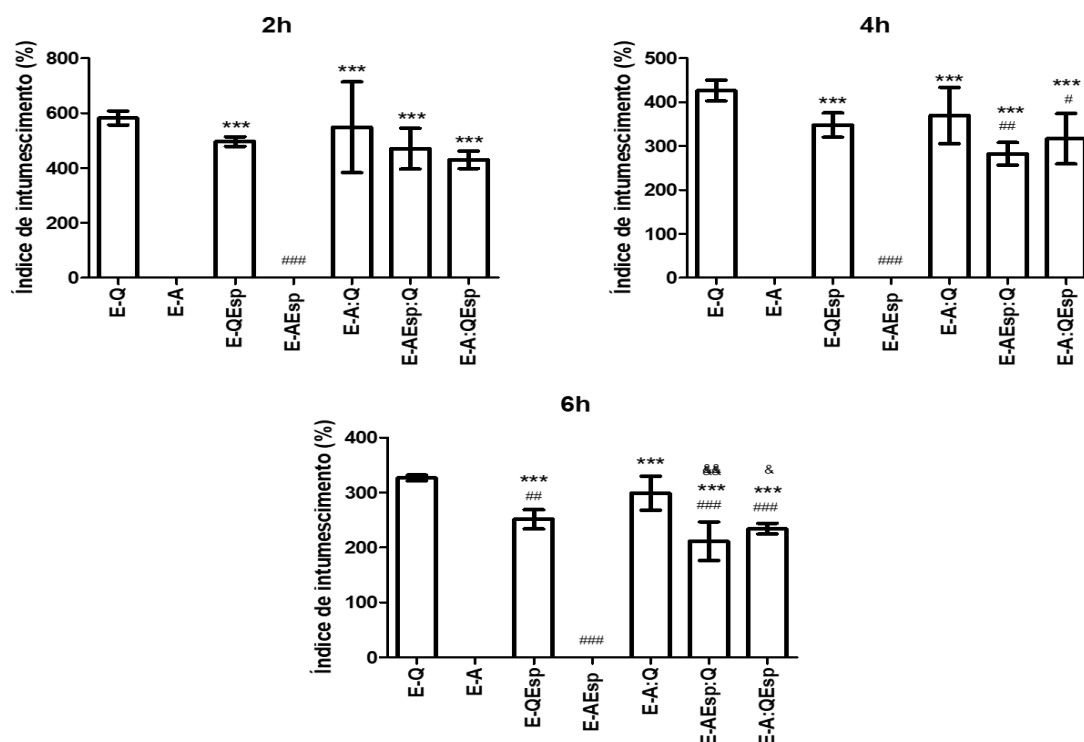


Figura 14. Grau de intumescimento de diferentes esponjas após 2h e 4h de contato com tampão fosfato pH 7,2. #, ## e ###: diferença significativa para $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ em relação ao grupo controle Q respectivamente; ***: diferença significativa para $p < 0,001$ em relação ao grupo controle A; & e &&: diferença significativa para $p < 0,05$ e $p < 0,01$ em relação ao grupo controle A:Q, respectivamente. ANOVA seguido de Tukey.

As esponjas apresentaram alto potencial de intumescimento assim como no estudo realizado por He *et al.* (2021), que identificaram taxa de intumescimento de 750% utilizando um intervalo de tempo maior do que o deste estudo (200 – 1000 minutos). Ademais, o mesmo estudo também apresentou resultados semelhantes no que tange à diminuição da capacidade de absorção conforme o decorrer do tempo, onde a maior taxa de intumescimento ocorreu nos primeiros 200 minutos e passou a diminuir gradativamente conforme o decorrer do tempo, corroborando os achados deste.

Após 6h, a esponja de quitosana contendo espirulina (E-QEsp – 251%) passa a apresentar intumescimento inferior a E-Q (326%). As esponjas contendo os dois polímeros (E-AQ) mantêm seu intumescimento similar a E-Q. Observou-se que as esponjas E-AEspQ e E-AQEsp diminuíram seu índice de intumescimento quando comparadas a E-AQ. Estes resultados sugerem que a inserção de espirulina pode ter alterado a formação polieletrólitos entre as cadeias poliméricas dos polímeros em questão.

5.2.4 Calorimetria Diferencial de Varredura e Análise Termogravimétrica

As técnicas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA) podem ser utilizadas para compor um método de estudo para avaliação da estabilidade térmica dos materiais. Nesta primeira, é realizada a mensuração do fluxo de calor durante a variação de temperatura. Na segunda técnica, enquanto a amostra é aquecida, avalia-se a variação da massa em função da temperatura.

As curvas de DSC de todas as amostras apresentaram um pico endotérmico referente à etapa de desidratação, o que é atribuído à energia necessária para a perda de massa de moléculas de água adsorvidas às cadeias poliméricas. Todas as esponjas apresentaram apenas um pico entre a temperatura ambiente e 150°C (Figuras 15 e 16), indicando que não existe separação de fases (ALAGHA *et al.*, 2020).

A etapa de evaporação foi registrada por um largo pico endotérmico, localizado próximo a 100°C. A variação entálpica (ΔH) endotérmica nesta faixa de temperatura se apresentou baixa para as amostras E-A (58 J/g) e E-AEspQ (48 J/g), aumentando ligeiramente para as amostras E-Q (122 J/g), E-AQ (103 J/g) e E-QEsp (112 J/g) e drasticamente aumentada para a amostra E-AQEsp (383,9 J/g) e E-AEsp (168 J/g) (Tabela 3). Este aumento pode estar relacionado ao aumento de água adsorvida e/ou forte interação da água com as moléculas que formam a esponja. Estas duas últimas amostras não apresentaram pico exotérmico evidente.

De acordo com os achados de Lencina *et al.* (2013) o pico endotérmico demonstrado nas esponjas de alginato pode estar relacionado à perda de água associada a grupos hidrofílicos do alginato, enquanto picos exotérmicos resultam da degradação do alginato por desidratação e reações de despolimerização subsequentes à descarboxilação parcial dos grupos carboxílicos protonados e reações oxidativas.

Por outro lado, E-A e E-AEsp manifestaram pico endotérmico discreto em 246°C e 241°C respectivamente. Segundo Nair, Bindhu e Reena (2020), o pico endotérmico observado a 245°C pode estar atribuído à temperatura de fusão do alginato de sódio. Além disso, apresentam um pico exotérmico discreto próximo a 294°C, o qual se refere à degradação de polieletrólitos e reações de despolimerização possivelmente devido à descarboxilação parcial do polieletrólito (KAPAREKAR; PODDAR; ANANDASADAGOPAN, 2021). Os picos exotérmicos destas amostras foram discretos não sendo possível a quantificação da variação entálpica. Os achados supracitados podem ser observados na Figura 15.

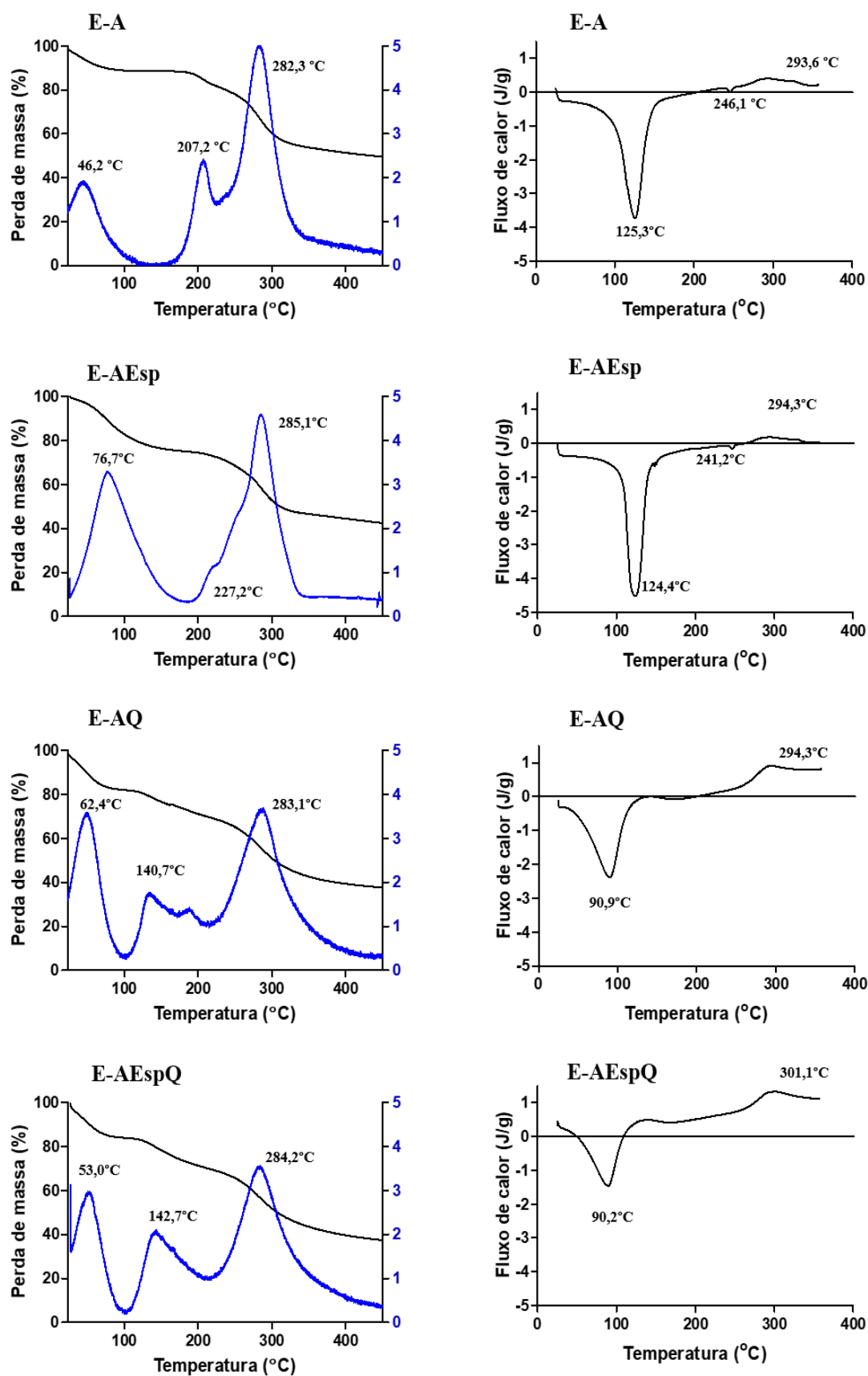


Figura 15. Análise térmica (TGA/DTG e DSC) das esponjas de alginato (E-A), alginato contendo espirulina (E-AEsp), alginato e quitosana (E-AQ) e alginato e quitosana contendo espirulina (E-AEspQ).

Foi possível observar pico exotérmico na faixa de 294°C para E-AQ ($\Delta H = 83,16$ J/g, aumento em relação a E-A) e ainda maior para E-AEspQ em 301,1°C ($\Delta H = 188,7$ J/g), demonstrando que na etapa de descarboxilação, E-AEspQ liberou maior energia para se degradar que E-AQ (Tabela 3).

Ao comparar a amostra E-Q em relação à E-QEsp) tornou-se notória a presença de picos exotérmicos referentes à degradação em temperaturas próximas (~297°C), com ΔH próximos também (64,7 J/g e 71,7 J/g, respectivamente). Destarte, Leśniewski *et al.* (2023) trazem achados semelhantes ao deste estudo, nos quais, a quitosana apresenta faixa de termodegradação semelhante à ~300°C.

Assim, de maneira semelhante ao ocorrido em (E-Q e E-QEsp), as amostras E-AQ e E-AQEsp também apresentaram temperaturas aproximadas (~293°C) no que tange ao evento exotérmico referente a degradação. Entretanto, E-AQEsp apresentou ΔH irrelevante. Os picos de exotermia, atribuídos geralmente às etapas de degradação, foram evidenciados nas amostras E-Q, E-AQ e E-QEsp com ΔH variando entre 64 e 83 J/g, sendo aumentado para E-AEspQ ($\Delta H=188$ J/g).

O perfil termogravimétrico das amostras estudadas também pode ser observado nas figuras 15 e 16. Na 1ª etapa dos eventos termogravimétricos observados ocorre a desidratação da amostra. A esponja de alginato (E-A) foi a que apresentou menor perda de massa (11,4%). As esponjas obtidas da mistura de AQ contendo Esp (E-AEspQ e E-AQEsp) apresentaram perda de massa intermediária (16,2 e 16,8%), enquanto as demais apresentaram valores maiores que 20%.

Quanto às esponjas de alginato e quitosana 100% puras (ambas têm $T_{max} < 50^\circ\text{C}$), todas as formulações aumentaram o T_{max} quando existe a mistura com outras substâncias. E-AEsp foi que apresentou a maior T_{max} de desidratação (76,7°C) e a única amostra que apresentou apenas 2 eventos até 450°C, sugerindo interação entre substâncias da formulação. Uma maior T_{max} na etapa de desidratação pode significar uma maior dificuldade de liberar moléculas d'água. Isso pode representar maior aprisionamento de moléculas de água.

No que se refere às etapas 2 e 3, período de descarboxilação (Figura 15) a E-AEsp: teve apenas 2 etapas de perda de massa (desidratação e descaboxilação), perdendo 57,6% da sua massa total até 450°C, com pico máximo de degradação em 285,1°C, semelhante ao observado para a 3ª etapa das demais formulações. A esponja contendo apenas alginato possui T_{max} maior (207,2°C) que as demais formulações na 2ª etapa de perda de massa (entre 124 e 142°C), com perda de massa maior. Entretanto, a esponja de alginato é a que tem menor perda de massa total até 450°C, demonstrando maior estabilidade térmica entre 100 e 200°C. E-AEspQ e E-AQEsp apresentaram perfil de termodegradação semelhantes.

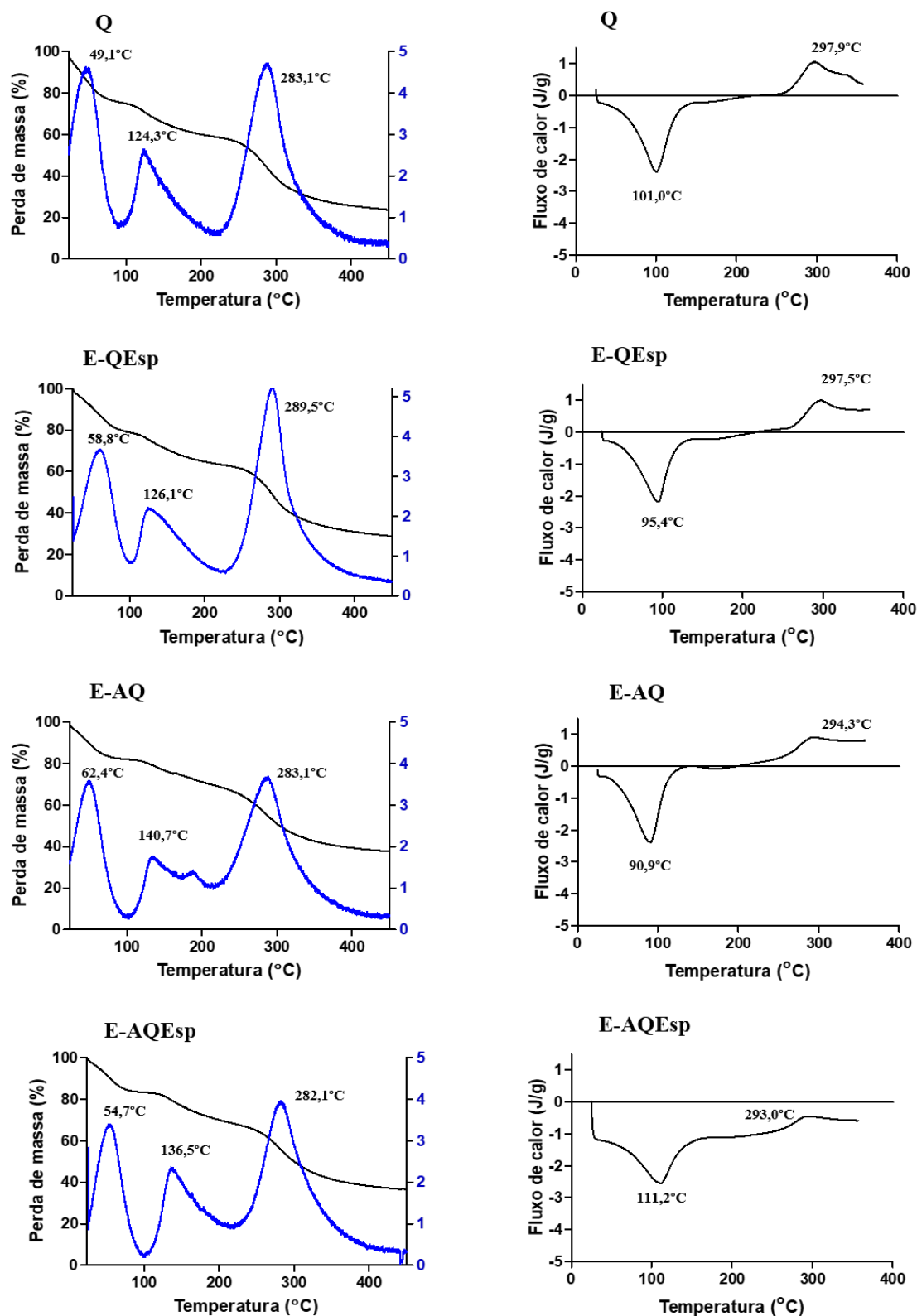


Figura 16. Análise térmica (TGA/DTG e DSC) das esponjas de quitosana (E-Q), quitosana contendo espirulina (E-QEsp), alginato e quitosana (E-A:Q) e alginato e quitosana contendo espirulina (E-AQEsp).

Tabela 3. Análise térmica das esponjas desenvolvidas

Amostra	DSC		TGA				E-A:
	ΔH (J/g)		Perda de massa (%)				
	Endotermia entre 25 e 200°C	Exotermia entre 200 e 350°C	Evento 1	Evento 2	Evento 3	Total até 450°C (%)	
E-A	58,8	Nd	11,4	22,0	17,0	50,4	
E-Q	122,6	64,7	24,2	17,4	34,7	76,3	
E-AQ	103,9	83,2	20,8	12,7	32,6	66,1	
E-AEsp	168,3	Nd	23,7	-	33,9	57,6	
E-AEspQ	47,8	188,7	16,2	14,2	32,2	62,6	
E-QEsp	112,4	71,7	21,4	15,2	34,6	71,2	
E-AQEsp	383,9	Nd	16,8	14,5	32,0	63,3	

esponja de alginato; E-Q: esponja de quitosana; E-AQ: esponja de alginato:quitosana; E-AEsp: esponja de alginato contendo espirulina; E-AEspQ: esponja de alginato contendo espirulina:quitosana; E-QEsp: esponja de quitosana contendo espirulina; E-AQEsp: esponja de alginato:quitosana contendo espirulina.

Na terceira etapa, entre 300°C - 450°C, onde as amostras chegaram a perder aproximadamente 50% da massa total, a perda de massa pode estar associada à liberação de compostos voláteis ou a destruição de grupos carboxila na estrutura dos compósitos, e a despolimerização da cadeia de biopolímeros (NAGHSHINEH, TAHVILDARI E NOZARI, 2019; AYDINOĞLU E ÜNAL, 2021). Ademais, as esponjas de quitosana e genipina contendo biomassa de espirulina apresentaram maior estabilidade térmica, sendo esta estabilidade diretamente proporcional à quantidade de biomassa presente nas esponjas (AYDINOĞLU E ÜNAL, 2021).

Chen *et al.* (2021) avaliaram a curva termogravimétrica em esponjas de alginato, gelatina, esponjas contendo os dois polímeros em diferentes proporções. Todas as esponjas apresentaram perfil de decomposição térmica semelhante durante o processo de aquecimento. Neste estudo, a massa residual das esponjas com maiores concentrações de alginato possuía densidade superior às demais amostras, acredita-se que em decorrência dos íons de cálcio presentes nas referidas amostras.

5.2.5 Teste mecânico

A força máxima para as esponjas sob compressão que reflete a “dureza” do material varia em função de sua composição (LAI *et al.*, 2003). Esponjas contendo apenas um polímero (E-Q e E-A) apresentaram tensão máxima diferentes entre si, onde as esponjas de alginato apresentaram tensão maior que as de quitosana ($p < 0,001$). Quando se compara E-AEsp com E-A, observou-se que a introdução da espirulina diminuiu a tensão máxima ($p < 0,001$). O

contrário foi observado quando se compara E-Q e E-QEsp, onde a introdução da espirulina na formulação aumentou a tensão (figura 17). Corroborando tais achados, um estudo realizado por Tekay, Aydinoğlu e Şen (2019), que avaliou a resistência mecânica de hidrogéis de quitosana com e sem biomassa de espirulina e nanocompósitos de argila, identificou que a inserção dessa biomassa tende a aumentar a tensão para compressão do material, característica esta que pode estar relacionada à interação entre os grupos funcionais da quitosana e da espirulina.

A esponja E-AQ possui a menor tensão entre todas as formulações estudadas. Entretanto, a introdução da espirulina nesta formulação aumentou a tensão, independente se a biomassa foi incorporada na dispersão de alginato (E-AEspQ) ou de quitosana (E-AQEsp). Estas duas últimas apresentaram tensão semelhantes entre si ($p>0,05$) (figura 17).

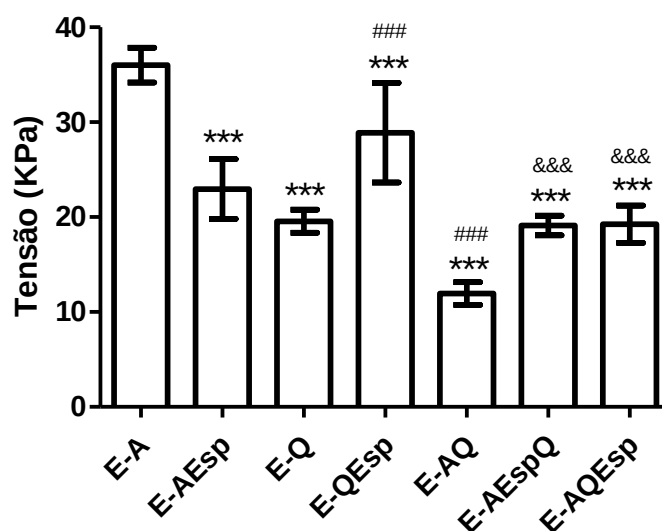


Figura 17. Tensão máxima de compressão das esponjas. E-A: esponja de alginato; E-Q: esponja de quitosana; E-AQ: esponja de alginato:quitosana; E-AEsp: esponja de alginato contendo espirulina; E-AEspQ: esponja de alginato contendo espirulina:quitosana; E-QEsp: esponja de quitosana contendo espirulina; E-AQEsp: esponja de alginato:quitosana contendo espirulina. *** $p<0,001$ comparado com E-A; ### $p<0,001$ comparado a E-Q; &&& $p<0,001$ comparado a E-AQ.

Em relação ao módulo de elasticidade, as amostras E-Q e E-A apresentaram valores significativamente semelhantes ($p>0,05$). E-AEsp também não apresentou alteração no módulo de elasticidade ($p>0,05$) quando comparadas a E-A e E-Q. E-QEsp foi a amostra que apresentou maior módulo de elasticidade dentre as amostras estudadas e o polieletrólito E-AQ apresentou o menor valor para este parâmetro. Ao se adicionar a espirulina, independentemente da dispersão em que foi adicionada, houve um aumento no módulo elástico, porém ainda se mantendo menor que as demais amostras (figura 18). O módulo elástico mede a resistência do material à deformação elástica, ou seja, reflete a força capaz de tornar a deformação irreversível. Além disso, materiais de baixo módulo são flexíveis e se

deformam com facilidade quando comprimidos. Materiais de alto módulo de Young possuem dificuldade de compressão. Quanto maior o módulo de elasticidade, menor a deformação para uma dada tensão.

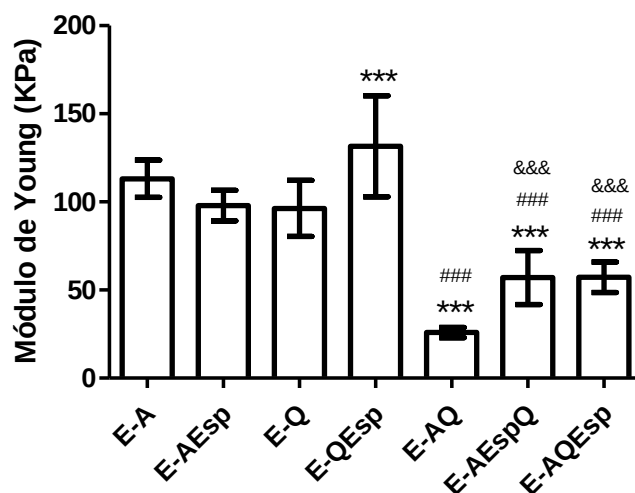


Figura 18. Módulo de elasticidade de diferentes esponjas. E-A: esponja de alginato; E-Q: esponja de quitosana; E-AQ: esponja de alginato:quitosana; E-AEsp: esponja de alginato contendo espirulina; E-AEspQ: esponja de alginato contendo espirulina:quitosana; E-QEsp: esponja de quitosana contendo espirulina; E-AQEsp: esponja de alginato:quitosana contendo espirulina. *** $p < 0,001$ comparado com E-A; ### $p < 0,001$ comparado a E-Q; &&& $p < 0,001$ comparado a E-AQ.

5.2.6 Testes de coagulação do sangue total *in vitro*

A avaliação *in vitro* da capacidade hemostática das esponjas foi realizada utilizando BCI. Segundo Sun *et al.* (2024) apud Shu *et al.* (2019) um BCI mais baixo indica um potencial hemostático mais forte dos biomateriais.

Em até cinco minutos após o contato com o sangue, a amostra E-Q foi a que apresentou maior BCI comparado a todas as amostras estudadas ($p < 0,001$) sugerindo menor capacidade pró-coagulante nesse tempo que as demais. As amostras E-A e E-AQ apresentaram BCI estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) e com menores valores entre as amostras estudadas inferindo melhor propriedade coagulante em até cinco minutos.

A incorporação de Esp em E-A aumentou BCI ($p < 0,001$) enquanto na E-Q proporcionou diminuição do BCI ($p < 0,001$). A incorporação de Esp em E-AQ aumentou BCI ($p < 0,001$) independentemente de onde a espirulina foi incorporada (E-AEspQ = E-AQEsp). Por outro lado, a inserção de Esp diminuiu a atividade coagulante em relação a E-A e E-AQ.

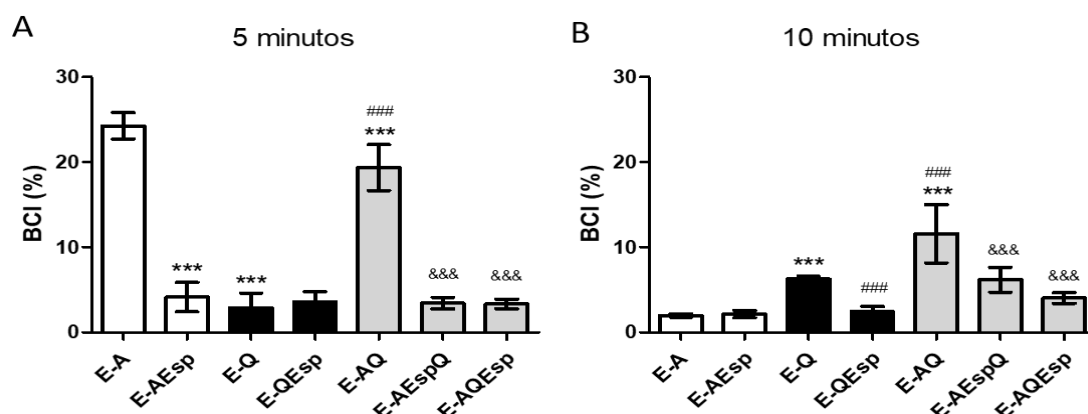


Figura 16. Índice de coagulação do sangue com base no BCI (%). E-A: esponja de alginato; E-Q: esponja de quitosana; E-A:Q: esponja de alginato:quitosana; E-AEsp: esponja de alginato contendo espirulina; E-AEsp:Q: esponja de alginato contendo espirulina:quitosana; E-QEsp: esponja de quitosana contendo espirulina; E-A:QEsp: esponja de alginato:quitosana contendo espirulina. *** diferença significativa para $p < 0,001$ em relação a A; ### diferença significativa para $p < 0,001$ em relação a Q; &&& diferença significativa para $p < 0,001$ em relação a AQ.

Em até 10 minutos após o contato com sangue, as amostras E-A, E-AEsp e E-QEsp apresentaram maior BCI comparado a todas as amostras estudadas ($p < 0,001$), sendo equivalentes ($p > 0,05$). Por outro lado, as amostras E-Q e E-AQ apresentaram BCI estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) e com menores valores entre as amostras estudadas. A incorporação de Esp em E-A não alterou BCI ($p > 0,05$), enquanto a em E-Q aumentou o BCI ($p < 0,001$). Além disso, a incorporação de espirulina em E-AQ aumentou BCI ($p < 0,001$) para AQEsp, entretanto para E-AEspQ não houve diferença ($p > 0,05$). As amostras E-AEspQ e E-AQEsp apresentaram BCI semelhantes ($p > 0,05$). Por outro lado, a inserção de Esp melhorou a atividade coagulante em relação a E-Q e E-AQ.

A introdução da espirulina em todos os polímeros parece potencializar a atividade coagulativa das esponjas produzidas com apenas um polímero e também das esponjas formadas por interação eletrostática da quitosana e alginato. Ainda não se sabe especificamente qual mecanismo ou princípio ativo está diretamente ligado à esta condição. A espirulina é um micro-organismo rico em macro e micronutrientes e pode contribuir para a entrega de diversas moléculas de maneira simultânea, as quais podem atuar como agentes coagulantes.

A vitamina K, especialmente na forma ativa hidroquinona (K1), desempenha um papel essencial no processo de coagulação sanguínea. A enzima γ -glutamylcarboxilase (GGCX) converte resíduos de ácido glutâmico em ácido γ -carboxiglutâmico em proteínas dependentes de vitamina K (VKDP). Essa modificação permite que essas proteínas se liguem a íons de cálcio, aumentando sua afinidade e desencadeando sua atividade biológica (JUNG *et al.*, 2022).

Conclusões

A espirulina apresentou maior teor de ficocianina que as demais, entretanto, a *nannochloropsis sp.* apresentou maiores teores de clorofilas a e b e carotenoides que todas as outras anteriormente citadas. No que se refere ao teor de vitamina k1, os extratos apolares de todas as biomassas apresentaram tempo de retenção semelhante ao padrão comercial injetado no cromatógrafo. Ao comparar o teor de vitamina k1 presente nos três micro-organismos com base na área demonstrada no cromatograma, foi possível observar maior quantidade deste composto em AC do que nas demais, ficando a *nannochloropsis sp.* e a espirulina com menores resultados, respectivamente.

Os resultados obtidos neste estudo indicam a viabilidade da incorporação da espirulina em polímeros como quitosana e alginato, uma vez que a adição de espirulina demonstrou contribuir significativamente para o desenvolvimento de um produto hemostático promissor. Dessa maneira, os testes de coagulação realizados revelaram que, em todas as amostras, a inserção de espirulina promoveu potencialização da atividade coagulativa.

REFERÊNCIAS

- ALAGHA, A.; NOURALLAH, A.; HARIRI, S. Characterization of dexamethasone loaded collagen-chitosan sponge and in vitro release study. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101449, 2020
- ALAGHA, Amjad; NOURALLAH, Abdulwahab; HARIRI, Sahar. Caracterização de esponja de colágeno-quitosana carregada com dexametasona e estudo de liberação in vitro. **Jornal de Ciência e Tecnologia de Entrega de Medicamentos**, v. 101449, 2020.
- ALFADHLY, N. K.; ALHELFI, N.; ALTEMIMI, A. B.; VERMA, D. K.; CACCIOLA, F.; & NARAYANANKUTTY, A. Trends and technological advancements in the possible food applications of Spirulina and their health benefits: A Review. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5584, 2022.
- AMPOFO, J.; ABBEY, L.. Microalgae: Bioactive composition, health benefits, safety and prospects as potential high-value ingredients for the functional food industry. **Foods**, v. 11, n. 12, p. 1744, 2022.
- AMPOFO, Josephine; ABBEY, Lord. Microalgae: Bioactive composition, health benefits, safety and prospects as potential high-value ingredients for the functional food industry. **Foods**, v. 11, n. 12, p. 1744, 2022.
- ANDERSON, J. M.; CHOW, W. S.; PARK, Y. The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. **Photosynthesis research**, v. 46, p. 129-139, 1995.
- ANDREEVA, A. P., SHEVCHENKO, M. A., BUDENKOVA, E. A., ULRIKH, E. V., SUKHIKH, S. A., & DOLGANIUK, V. F. Microalgae as a source of biologically active substances. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing, 2023.
- ASATULLAYEV, Anvar Narzullayevich; JABBOROVA, Oygul Gaparovna. Bleeding and its Types, Organization of Emergency Assistance in Bleeding. **European Journal of Life Safety and Stability** (2660-9630), v. 13, p. 111-116, 2022.
- ASGHARI, A.; FAZILATI, M.; LATIFI, A. M.; SALAVATI, H.; & CHOOPANI, A. A review on antioxidant properties of Spirulina. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 345-351, 2016.
- AYDINOĞLU, D.; ÜNAL, M. Evaluation of the influence of spirulina microalgae on the drug delivery characteristics of genipin cross-linked chitosan hydrogels. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 68, n. 17, p. 1020-1033, 2019.
- BARTA, Daniel Gabriel; COMAN, Vasile; VODNAR, Dan Cristian. Microalgas como fontes de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3: Aspectos biotecnológicos. **Pesquisa de Algas**, v. 102410, 2021.
- BARUA, E.; DEOGHARE, A. B.; CHATTERJEE, S.; & MATE, V. R Characterization of mechanical and micro-architectural properties of porous hydroxyapatite bone scaffold using green microalgae as binder. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 44, p. 7707-7722, 2019.
- BAYELE, H.K.; MURDOCK, P.J.; PERRY, D.J.; PASI, K.J. Simple shifts in redox/thiol balance that perturb blood coagulation. **FEBS letters**, v. 510, n. 1-2, p. 67-70, 2002.
- BENESCH, J.; TENGVALL, P. Blood protein adsorption onto chitosan. **Biomateriais**, v. 23, p. 2561–2568, 2002.

BERKNER, Kathleen L. A carboxilase dependente de vitamina K. **Anu. Rev.** , v. 25, pág. 127-149, 2005.

BERROUANE, N. E. H.; ATTAL, F. S.; BENCHABANE, A.; SAGHOUR, I.; BITAM, A., GACHOVSKA, T.; & AMIALI, M. Freeze–thaw-, enzyme-, ultrasound-and pulsed electric field-assisted extractions of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* dry biomass. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 16, n. 2, p. 1625-1635, 2022.

BICKELL, W. H.; WALL JR, M. J.; PEPE, P. E.; MARTIN, R. R.; GINGER, V. F.; ALLEN, M. K.; & MATTOX, K. L. Immediate versus delayed fluid resuscitation for hypotensive patients with penetrating torso injuries. **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 17, p. 1105-1109, 1994.

BINNETOĞLU, K.; KUMANDAS, A.; EKICI, H.; & ÖZBAYKUŞ, A. C. Comparison of the algal hemostatic agent with floseal in rat liver laceration bleeding model. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 36, 2022.

BLOOM, A. L. Physiology of blood coagulation. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 20, n. Suppl. 1, p. 14-29, 1990.

BOLTON-SMITH, C. *et al.* Compilation of a provisional UK database for the phylloquinone (vitamin K1) content of foods. **The British Journal of Nutrition**, v. 83, n. 4, p. 389–399, abr. 2000.

BOOTH, S. L.; SADOWSKI, J. A.; PENNINGTON, J. A. T. Phylloquinone (Vitamin K1) Content of Foods in the U.S. Food and Drug Administration's Total Diet Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 6, p. 1574–1579, 1 jun. 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Datasus Informações de Saúde. **Sistema de Informações sobre Mortalidade**. Brasília (DF) 2022.

BRUGHITTA, E.; ATZORI, F.; GAMBONI, E.; FODDI, S.; CASULA, M.; FAIS, G.; & CONCAS, A. Cultivation of Cyanobacteria and Microalgae using Simulated in-situ Available Resources for the Production of useful Bio-compounds on Mars: Modelling of Experiments. **Chemical Engineering Transactions**, v. 98, p. 111-116, 2023.

CADE, M.; MUNOZ-GARCIA, J.; BABUTY, A.; FOUASSIER, M.; HEYMANN, M. F.; MONAHAN, P. E.; & HEYMANN, D. FVIII at the crossroad of coagulation, bone and immune biology: Emerging evidence of biological activities beyond hemostasis. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 1, p. 102-116, 2022.

CALLCUT, Rachael A. *et al.* The Why & How Our Trauma Patients Die: A Prospective Multicenter Western Trauma Association Study. **The journal of trauma and acute care surgery**, v. 86, n. 5, p. 864, 2019.

CANNON, J. W. Hemorrhagic shock. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 4, p. 370-379, 2018.

CARAZO, A.; MACÁKOVÁ, K.; MATOUŠOVÁ, K.; KRČMOVÁ, L. K.; PROTTI, M.; & MLADĚNKA, P. Vitamin A update: forms, sources, kinetics, detection, function, deficiency, therapeutic use and toxicity. **Nutrients**, v. 13, n. 5, p. 1703, 2021.

CASAZZA, A. A.; SPENNATI, E.; CONVERTI, A.; & BUSCA, G. Production of carbon-based biofuels by pyrolysis of exhausted *Arthrospira platensis* biomass after protein or lipid recovery. **Fuel Processing Technology**, v. 201, p. 106336, 2020.

CASTILLO-HENRÍQUEZ, L.; CASTRO-ALPÍZAR, J.; LOPRETTI-CORREA, M.; & VEGA-BAUDRIT, J. Exploration of bioengineered ESPONJAS composed of thermo-responsive polymers for drug delivery in wound healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1408, 2021.

CHEN, Kai *et al.* A novel alginate/gelatin sponge combined with curcumin-loaded electrospun fibers for postoperative rapid hemostasis and prevention of tumor recurrence. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 1339-1350, 2021.

CHIARA, O.; CIMBANASSI, S.; BELLANOVA, G.; CHIARUGI, M.; MINGOLI, A.; OLIVERO, G.; & MINIELLO, S. A systematic review on the use of topical hemostats in trauma and emergency surgery. **BMC surgery**, v. 18, n. 1, p. 1-20, 2018.

CHITTAPUN, S.; JONJAROEN, V.; KHUMRANGSEE, K.; & CHAROENRAT, T. C-phycocyanin extraction from two freshwater cyanobacteria by freeze thaw and pulsed electric field techniques to improve extraction efficiency and purity. **Algal Research**, v. 46, p. 101789, 2020.

CLAASSEN, J. A.; THIJSSSEN, D. H.; PANERAI, R. B.; & FARACI, F. M. Regulation of cerebral blood flow in humans: physiology and clinical implications of autoregulation. **Physiological reviews**, v. 101, n. 4, p. 1487-1559, 2021.

CLINIC, CLEVELAND. 2021. **Hemostasis.** Disponível em: <https://my.clevelandclinic.org/health/symptoms/21999-hemostasis>. <Acessado em: 02/12/2023>

CURRY, Nicola S.; DAVENPORT, Ross. Transfusion strategies for major haemorrhage in trauma. **British journal of haematology**, v. 184, n. 4, p. 508-523, 2019.

DA SILVA, K. S. O IMPACTO DAS CIANOBACTÉRIAS NA QUALIDADE DA ÁGUA DO LAGO DELMIRO GOUVEIA PARA O ABASTECIMENTO HUMANO DA VILA MOXOTÓ, BELMIRO GOUVEIA-ALAGOAS. **Revista Multidisciplinar do Sertão**, v. 4, n. 3, p. 250-260, 2022.

DAI, M.; ZHENG, X.; XU, X.; KONG, X.; LI, X.; GUO, G.; & QIAN, Z. Chitosan-alginate sponge: preparation and application in curcumin delivery for dermal wound healing in rat. **BioMed Research International**, v. 2009, 2009.

DE OLIVEIRA FERNANDES, V.; CAMARGO-SANTOS, D.; & ZORZAL-ALMEIDA, S. MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS CONTINENTAIS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO: PASSADO, PRESENTE E FUTURO. **Oecologia Australis**, v. 26, n. 2, p. 213-226, 2022.

DE PABLO-MORENO, J. A.; MIGUEL-BATUECAS, A.; DE SANCHA, M.; LIRAS, A. The magic of proteases: From a procoagulant and anticoagulant factor V to an equitable treatment of its inherited deficiency. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6243, 2023.

DEV, A.; MOHANBHAI, S. J.; KUSHWAHA, A. C.; SOOD, A.; SARDOIWALA, M. N.; CHOUDHURY, S. R.; & KARMAKAR, S. κ -carrageenan-C-phycocyanin based smart injectable hydrogels for accelerated wound recovery and real-time monitoring. **Acta Biomaterialia**, v. 109, p. 121-131, 2020.

DONG, R.; ZHANG, H.; GUO, B. Emerging hemostatic materials for non-compressible hemorrhage control. **National Science Review**, v. 9, n. 11, p. nwac162, 2022. (DONG; ZHANG; GUO, 2022)

DU, X.; WU, L.; YAN, H.; JIANG, Z.; LI, S.; LI, W., & ZHU, M. *et al.* Microchannelled alkylated chitosan sponge to treat noncompressible hemorrhages and facilitate wound healing. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2021.

ELDER, S. J. *et al.* Vitamin k contents of meat, dairy, and fast food in the u.s. Diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 463–467, 25 jan. 2006.

ERYALÇIN, Kamil Mert. Nutritional value and production performance of the rotifer *Brachionus plicatilis* Müller, 1786 cultured with different feeds at commercial scale. **Aquaculture International**, v. 27, n. 3, p. 875-890, 2019.

ESTRADA, J.E. P.; BESCÓS, P. B.; DEL FRESNO, A.M.V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Il farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 497-500, 2001.

FAIS, G.; MANCA, A.; BOLOGNESI, F.; BORSELLI, M.; CONCAS, A.; BUSUTTI, M.; & GIANNACCARE, G. Wide range applications of spirulina: from earth to space missions. **Marine Drugs**, v. 20, n. 5, p. 299, 2022.

FATHABAD, S. G.; TABATABAI, B.; JAFAR, S.; & SITTHER, V. Microcystin levels in selected cyanobacteria exposed to varying salinity. **Journal of water resource and protection**, v. 11, n. 4, p. 395, 2019.

FERLAND, GUYLAINE.; SADOWSKI, J. A. Vitamin K1 (phylloquinone) content of edible oils: effects of heating and light exposure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 10, p. 1869–1873, 1 out. 1992.

FLORES-RIVERA, O. I.; RAMÍREZ-MORALES, K.; MEZA-MÁRQUEZ, J. M.; & NAVA-LÓPEZ, J. A. Fisiología de la coagulación. **Revista Mexicana de Anestesiología**, v. 37, n. S2, p. 382-386, 2014.

FURLAN, B. J.; ZATTA, P. H. S.; ANTENAZA, V. C. P.; MARTINS, L. D. S.; & MARIANO, A. B. Estudo do crescimento de microalgas em meio de cultivo CHU e dejetos suínos. **Meio Ambiente, Sustentabilidade e Tecnologia**, v. 6, p. 204-211, 2021.

FURUYA, D. C.; COSTA, S. A. D.; OLIVEIRA, R. C. D.; FERRAZ, H. G.; PESSOA, A.; & COSTA, S. M. D. Fibers obtained from alginate, chitosan and hybrid used in the development of scaffolds. **Materials Research**, v. 20, p. 377-386, 2017.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química nova**, v. 31, p. 1800-1806, 2008.

GHAFOOR, K.; AL JUHAIMI, F.; ÖZCAN, M. M.; USLU, N.; BABIKER, E. E., & AHMED, I. A. M. Total phenolics, total carotenoids, individual phenolics and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) rhizome as affected by drying methods. **Lwt**, v. 126, p. 109354, 2020.

GODSWILL, A. G.; SOMTOCHUKWU, I. V.; IKECHUKWU, A. O.; & KATE, E. C. Health benefits of micronutrients (vitamins and minerals) and their associated deficiency diseases: A systematic review. **International Journal of Food Sciences**, v. 3, n. 1, p. 1-32, 2020. (GODSWILL *et al.*, 2020)

GORGICH, M.; PASSOS, M.L.; MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; SARAIVA, M.L.M.; & CAETANO, N.S. Melhorar a extração e purificação de ficocianina de *Arthrospira* sp. com menor consumo de energia. **Relatórios Energéticos**, v. 6, p. 312-318, 2020.

GÓRKA, B.; KORZENIOWSKA, K.; LIPOK, J.; & WIECZOREK, P. P. The Biomass of algae and algal extracts in agricultural production. **Algae biomass: Characteristics and applications: Towards algae-based products**, p. 103-114, 2018.

GRUSZECKI, WIESŁAW I.; STRZAŁKA, KAZIMIERZ. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1740, n. 2, p. 108-115, 2005.

HALL, J.E.; HALL, M.E. **Guyton & Hall - Tratado de Fisiologia Médica**. Grupo GEN, 2021. 9788595158696. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595158696/>. Acesso em: 22 Sep 2022.

HAN, X.; ZENG, H.; BARTOCCI, P.; FANTOZZI, F.; & YAN, Y. Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: a review. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 25, 2018.

HAO, Z.; JIN, D.Y.; CHEN, X.; SCHURGERS, L.J.; STAFFORD, D.W.; TIE, J.K. γ -Glutamyl carboxylase mutations differentially affect the biological function of vitamin K-dependent proteins. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 137, n. 4, p. 533-543, 2021.

HASSAN, S.; MEENATCHI, R.; PACHILLU, K.; BANSAL, S.; BRINDANGNANAM, P.; AROCKIARAJ, J.; & SELVIN, J. Identification and characterization of the novel bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria for pharmaceutical and nutraceutical applications. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 999-1029, 2022.

HE, Q.; GONG, K.; AO, Q.; MA, T.; YAN, Y.; GONG, Y.; & ZHANG, X. Positive charge of chitosan retards blood coagulation on chitosan films. **Journal of biomaterials applications**, v. 27, n. 8, p. 1032-1045, 2013.

HE, Y.; ZHAO, W.; DONG, Z.; JI, Y.; LI, M.; HAO, Y.; ZHOU, Q. A biodegradable antibacterial alginate/carboxymethyl chitosan/Kangfuxin sponges for promoting blood coagulation and full-thickness wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 182-192, 2021.

HENKELMAN, S.; RAKHORST, G.; BLANTON, J.; & VAN OEVEREN, W. Standardization of incubation conditions for hemolysis testing of biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 5, p. 1650-1654, 2009.

HICKMAN, D. A.; PAWLOWSKI, C. L.; SEKHON, U. D.; MARKS, J.; & GUPTA, A. S. Biomaterials and advanced technologies for hemostatic management of bleeding. **Advanced Materials**, v. 30, n. 4, p. 1700859, 2018.

HIHARA, YUKAKO; SONOIKE, KINTAKE; IKEUCHI, MASAHIKO. A novel gene, pmgA, specifically regulates photosystem stoichiometry in the cyanobacterium *Synechocystis* species PCC 6803 in response to high light. **Plant physiology**, v. 117, n. 4, p. 1205-1216, 1998.

HIRAUCHI, K. *et al.* Measurement of K vitamins in animal tissues by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal of Chromatography**, v. 497, p. 131-137, 29 dez. 1989.

HOJO, K. *et al.* Quantitative measurement of tetrahydromenaquinone-9 in cheese fermented by propionibacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4078-4083, set. 2007.

HONG, J. K.; GAO, L.; SINGH, J.; GOH, T.; RUHOFF, A. M.; NETO, C.; & WATERHOUSE, A. Evaluating medical device and material thrombosis under flow: current and emerging technologies. **Biomaterials Science**, v. 8, n. 21, p. 5824-5845, 2020.

HUANG, L.; LIU, G. L.; KAYE, A. D.; & LIU, H. Advances in topical hemostatic agent therapies: a comprehensive update. **Advances in therapy**, v. 37, p. 4132-4148, 2020.

IBRAHIM, T. N. B. T.; FEISAL, N. A. S.; KAMALUDIN, N. H.; CHEAH, W. Y.; HOW, V.; BHATNAGAR, A.; SHOW, P. L. Biological active metabolites from microalgae for healthcare and pharmaceutical industries: a comprehensive review. **Bioresource Technology**, p. 128661, 2023.

ISMAIL, G. A.; EL-SHEEKH, M. M.; SAMY, R. M.; & GHEDA, S. F. Antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities of biosynthesized silver nanoparticles by phycobiliprotein crude extract of the cyanobacteria *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia*. **Bionanoscience**, v. 11, p. 355-370, 2021.

JACINAVICIUS, F. R.; GAMA JÚNIOR, W. A.; AZEVEDO, M. D. P.; & SANTANNA, C. Manual para cultivo de cianobactérias. **São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente**, 2013.

JENSEN, G. S.; ATTRIDGE, V. L.; BEAMAN, J. L.; GUTHRIE, J.; EHMANN, A.; & BENSON, K. F. Antioxidant and anti-inflammatory properties of an aqueous cyanophyta extract derived from *Arthrospira platensis*: Contribution to bioactivities by the non-phycoerythrin aqueous fraction. **Journal of medicinal food**, v. 18, n. 5, p. 535-541, 2015.

JIN, M.; SHI, J.; ZHU, W.; YAO, H.; & WANG, D. A. Polysaccharide-based biomaterials in tissue engineering: a review. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 27, n. 6, p. 604-626, 2021.

JOCHEMS, D. *et al.* Increased reduction in exsanguination rates leaves brain injury as the only major cause of death in blunt trauma. **Injury**, v. 49, n. 9, p. 1661-1667, 2018.

JOHNSON, Don *et al.* Effects of intraosseous and intravenous administration of Hextend® on time of administration and hemodynamics in a Swine model. **J Spec Oper Med**, v. 14, n. 1, p. 79-85, 2014. (JOHNSON, 2014)

JONES, L. W.; MYERS, Jack. Enhancement in the blue-green alga, *Anacystis nidulans*. **Plant Physiology**, v. 39, n. 6, p. 938, 1964.

JUNG, F.; BRAUNE, S.; JUNG, C. H.; KRÜGER-GENGE, A.; WALDECK, P.; PETRICK, I.; & KÜPPER, J. H. Lipophilic and hydrophilic compounds from *arthrospira platensis* and its effects on tissue and blood cells—an overview. **Life**, v. 12, n. 10, p. 1497, 2022.

KAMAO, M. *et al.* Vitamin K content of foods and dietary vitamin K intake in Japanese young women. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 53, n. 6, p. 464–470, dez. 2007.

KANG, B. S.; NA, Y. C.; JIN, Y. W. Comparison of the wound healing effect of cellulose and gelatin: an in vivo study. **Archives of plastic surgery**, v. 39, n. 04, p. 317-321, 2012.

KAUR, R.; RAHMAN, A., MISHRA, M., SINGH, S. K., SUNDARAM, S., & ALOK, S. COMPARATIVE GROWTH ANALYSIS OF CYANOBACTERIA FROM DIVERSE HABITATS WITH REFERENCE TO PIGMENTS. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, vol. 11, n. 6, p. 2984-2989, 2020.

KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial cell factories**, v. 17, n. 1, p. 1-21, 2018.

KHARWAR, S.; BHATTACHARJEE, S.; MISHRA, A. K. Disentangling the impact of sulfur limitation on exopolysaccharide and functionality of Alr2882 by in silico approaches in *Anabaena* sp. PCC 7120. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 5, p. 1447-1468, 2021.

KIOUPTSI, K.; REINHARDT, C. Physiological roles of the von Willebrand factor-factor VIII interaction. **Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and Other Body Fluid Proteins**, p. 437-464, 2020.

KOIVU, T. J. *et al.* Determination of Phylloquinone in Vegetables, Fruits, and Berries by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 4644–4649, 1 dez. 1997.

KOIVU-TIKKANEN, T. J.; OLLILAINEN, V.; PIIRONEN, V. I. Determination of Phylloquinone and Menaquinones in Animal Products with Fluorescence Detection after Postcolumn Reduction with Metallic Zinc. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 6325–6331, 1 dez. 2000.

KORNBLITH, Lucy Z.; MOORE, Hunter B.; COHEN, Mitchell J. Trauma-induced coagulopathy: the past, present, and future. **Journal of thrombosis and haemostasis**, v. 17, n. 6, p. 852-862, 2019. (KORNBLITH; MOORE; COHEN, 2019).

KOZEN, B. G.; KIRCHER, S. J.; HENAO, J.; GODINEZ, F. S.; & JOHNSON, A. S. An alternative hemostatic dressing: comparison of CELOX, HemCon, and QuikClot. **Academic Emergency Medicine**, v. 15, n. 1, p. 74-81, 2008.

LAI, H. L.; ABU'KHALIL, A.; CRAIG, D. QM. The preparation and characterisation of drug-loaded alginate and chitosan sponges. **International journal of pharmaceutics**, v. 251, n. 1-2, p. 175-181, 2003.

LAKSHMANAN, H. H. S.; ESTONILO, A.; REITSMA, S. E.; MELROSE, A. R.; SUBRAMANIAN, J.; ZHENG, T. J.; PUY, C. Revised model of the tissue factor pathway of thrombin generation: Role of the feedback activation of FXI. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 20, n. 6, p. 1350-1363, 2022.

LAPELUSA, A.; DAVE, H. D. Physiology, Hemostasis. 2019.

LENCINA, M. S.; ANDREUCETTI, N. A.; GÓMEZ, C. G.; & VILLAR, M. A. Recent studies on alginates based blends, composites, and nanocomposites. **Advances in Natural Polymers: Composites and Nanocomposites**, p. 193-254, 2013.

LEŚNIEWSKI, B.; KOTULA, M.; KUBIAK, A.; & PAJEWSKA-SZMYT, M. Thermostability of Selected Biological Materials. **Letters in Applied NanoBioScience**. Vol. 12, n. 3, 2023.

LI, S.; LI, X.; HO, S. How to enhance carbon capture by evolution of microalgal photosynthesis?. **Separation and Purification Technology**, v. 291, p. 120951, 2022.

LI, Y.; NAMAN, C. B.; ALEXANDER, K. L.; GUAN, H.; & GERWICK, W. H. The chemistry, biochemistry and pharmacology of marine natural products from *Leptolyngbya*, a chemically endowed genus of Cyanobacteria. **Marine drugs**, v. 18, n. 10, p. 508, 2020.

LIEBMAN, Howard A.; FURIE, Barbara C.; FURIE, Bruce. Hepatic Vitamin K–Dependent Carboxylation of Blood–Clotting Proteins. **Hepatology**, v. 2, n. 4, p. 488S-494S, 1982.

LIU, H. J.; XU, C. H.; ZHOU, Q.; WANG, F.; LI, W. M.; HA, Y. M.; & SUN, S. Q. Analysis and identification of irradiated *Spirulina* powder by a three-step infrared macro-fingerprint spectroscopy. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 85, p. 210-217, 2013.

LIU, L.; HU, E.; YU, K.; XIE, R.; LU, F.; LU, B.; LAN, G. Recent advances in materials for hemostatic management. **Biomaterials Science**, v. 9, n. 22, p. 7343-7378, 2021.

LU, W.; SHI, Y.; WANG, R.; SU, D.; TANG, M.; LIU, Y.; & LI, Z. ANTIOXIDANT ACTIVITY AND HEALTHY BENEFITS OF NATURAL PIGMENTS IN FRUITS: A REVIEW. **INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES**, v. 22, N. 9, P. 4945, 2021.

LU, Y.; XU, J. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology?. **Trends in plant science**, v. 20, n. 5, p. 273-282, 2015.

MA, R.; WANG, Y.; QI, H.; SHI, C.; WEI, G.; XIAO, L.; & GUO, Z. Nanocomposite sponges of sodium alginate/graphene oxide/polyvinyl alcohol as potential wound dressing: In vitro and in vivo evaluation. **Composites Part B: Engineering**, v. 167, p. 396-405, 2019.

MACARIO, I. P.; VELOSO, T.; FERNANDES, A. P.; MARTINS, M.; FRANKENBACH, S.; SERODIO, J.; ... & PEREIRA, J. L. Are cyanobacteria a nearly immortal source of high market value compounds?. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 98, n. 3, p. 734-743, 2023.

MAFRA J.R., L. L., DE SOUZA, D. A., MENEZES, M., SCHRAMM, M. A., & HOFF, R. Marine biotoxins: latest advances and challenges toward seafood safety, using Brazil as a case study. **Current Opinion in Food Science**, v. 53, p. 101078, 2023.

MAHDI, M. Z.; TITISARI, Y. N.; HADIYANTO, H.; & CHRISTWARDANA, M. Evaluation Of Spirulina, Nannochloropsis, and Chlorella Micro-algae Growth in Palm Oil Mill Effluent (POME) Medium with Variation of Medium Types and Time Adding Nutrient. **Journal of Bioresources and Environmental Sciences**, v. 1, n. 1, p. 27-32, 2022.

MALIK, A.; REHMAN, F. U.; SHAH, K. U.; NAZ, S. S.; & QAISAR, S. Hemostatic strategies for uncontrolled bleeding: A comprehensive update. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 109, n. 10, p. 1465-1477, 2021.

MANN, K.G.; BRUMMEL, K.; BUTENAS, S. What is all this thrombin for? **Journal of Thrombosis and Hemostasis**, v. 1, no. 7, p. 1504-1514, 2003.

MASAMOTO, K.; FURUKAWA, K. Accumulation of zeaxanthin in cells of the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 grown under high irradiance. **Journal of plant physiology**, v. 151, n. 3, p. 257-261, 1997.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; MANDIĆ, A. I.; BANTIS, F.; BÖHM, V.; BERGE, G. I. A.; BRNČIĆ, M.; & O'BRIEN, N. A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: Status quo, applications, patents, and research needs. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 8, p. 1999-2049, 2022.

MITRA B; GABBE B.J.; KAUKONEN K.M.; OLAUSSEN A; COOPER D.J.; CAMERON PA. *et al.* Long-term outcomes of patients receiving a massive transfusion after trauma. **Shock**, v. 42, n. 4, p. 307-312, 2014.

MLADĚNKA, P.; MACÁKOVÁ, K.; KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, L.; JAVORSKÁ, L.; MRŠTNÁ, K.; CARAZO, A. *et al.* Vitamin K—sources, physiological role, kinetics, deficiency, detection, therapeutic use, and toxicity. **Nutrition reviews**, v. 80, n. 4, p. 677-698, 2022.

MORANVILLE, Michael P.; MIEURE, Katherine D.; SANTAYANA, Elena M. Evaluation and management of shock states: hypovolemic, distributive, and cardiogenic shock. **Journal of pharmacy practice**, v. 24, n. 1, p. 44-60, 2011.

MOREIRA, M. S. J.; MACEDO, C. F. Ocorrência de florações de cianobactérias e consequências para a saúde pública no Nordeste do Brasil. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 46, n. 4, p. 181-192, 2022.

MURRAY C.J.L, LOPEZ A.D. Global health statistics a compendium of incidence prevalence and mortality estimates for over 200 conditions. Boston, MA: Harvard University Press; 1996.

NAGHSHINEH, N.; TAHVILDARI, K.; NOZARI, M. Preparation of chitosan, sodium alginate, gelatin and collagen biodegradable sponge composites and their application in wound healing and curcumin delivery. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 27, p. 2819-2830, 2019.

NAIR, RENJINI M.; BINDHU, B.; V.L., REENA. A polymer blend from Gum Arabic and Sodium Alginate-preparation and characterization. **Journal of Polymer Research**, v. 27, p. 1-7, 2020.

NAM, S. M.; MOONEY, D. Adesivos de tecido polimérico. **Revisões químicas** , v. 121, n. 18, pág. 11336-11384, 2021.

NAPOLITANO, L.M.; COHEN, M.J.; COTTON, B.A.; SCHREIBER, M.A.; MOORE, E.E. Tranexamic acid in trauma: how should we use it?. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 74, n. 6, p. 1575-1586, 2013.

NONNO, S.; & ULBER, R. A new strategy for a combined isolation of EPS and pigments from cyanobacteria. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 1729-1740, 2020.

NOURI, E.; ABBASI, H.; RAHIMI, E. Effects of processing on stability of water-and fat-soluble vitamins, pigments (C-phycoerythrin, carotenoids, chlorophylls) and colour characteristics of *Spirulina platensis*. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 10, n. 4, p. 335-349, 2018.

OSÓRIO, C.; MACHADO, S.; PEIXOTO, J.; BESSADA, S.; PIMENTEL, F. B.; C. ALVES, R.; & OLIVEIRA, M. B. P. Pigments content (chlorophylls, fucoxanthin and phycobiliproteins) of different commercial dried algae. **Separations**, vol. 7, n. 2, pág 33, 2020.

OSÓRIO, C.; MACHADO, S.; PEIXOTO, J.; BESSADA, S.; PIMENTEL, F. B. C.; ALVES, R.; & OLIVEIRA, M. B. P. Pigments content (chlorophylls, fucoxanthin and phycobiliproteins) of different commercial dried algae. **Separations**, v. 7, n. 2, p. 33, 2020.

PAN, S.; JEEVANANDAM, J.; DANQUAH, M. K. Benefits of algal extracts in sustainable agriculture. **Grand Challenges in Algae Biotechnology**, p. 501-534, 2019.

PARK, W. S.; KIM, H. J.; LI, M., LIM, D. H.; KIM, J.; KWAK, S. S.; & AHN, M. J. Two classes of pigments, carotenoids and c-phycoerythrin, in spirulina powder and their antioxidant activities. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 2065, 2018.

PENG, H. T.; SIDDIQUI, M. M.; RHIND, S. G.; ZHANGsa, J.; DA LUZ, L. T.; & BECKETT, A. Artificial intelligence and machine learning for hemorrhagic trauma care. **Military Medical Research**, v. 10, n. 1, p. 6, 2023.

PFEIFER, Roman *et al.* Patterns of mortality and causes of death in polytrauma patients—has anything changed?. **Injury**, v. 40, n. 9, p. 907-911, 2009.

PIIRONEN, V. *et al.* Determination of phyloquinone in oils, margarines and butter by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 473–480, 1 jul. 1997.

PODKOWA, A.; KRYCZYK-POPRAWA, A.; OPOKA, W.; & MUSZYŃSKA, B. Culinary–medicinal mushrooms: a review of organic compounds and bioelements with antioxidant activity. **European Food Research and Technology**, v. 247, p. 513-533, 2021.

Qiu, Y.; Gu, L.; Brözel, V.; Whitten, D.; Hildreth, M.; & Zhou, R. Unique proteomes implicate functional specialization across heterocysts, akinetes, and vegetative cells in *Anabaena cylindrica*. **bioRxiv**, p. 2020.06. 29.176149, 2020.

QIU, Y.; TIAN, S.; GU, L.; HILDRETH, M.; & ZHOU, R. Identification of surface polysaccharides in akinetes, heterocysts and vegetative cells of *Anabaena cylindrica* causing fluorescein-labeled lectins. **Archives of microbiology**, v. 201, p. 17-25, 2019.

QUICK, Armand J. The role of vitamins in hemostasis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 33, n. 02, p. 191-198, 1975.

RINAWATI, M.; SARI, L. A.; PURSETYO, K. T. Chlorophyll and carotenoids analysis spectrophotometer using method on microalgae. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, p. 012056, 2020.

RONCONI, R. W. F.; MOREIRA, L. H.; DE LIMA, C. J.; NETO, O. P.; & OSÓRIO, R. A. L. Tourniquets, types and techniques in emergency prehospital care: A narrative review. **Medical Engineering & Physics**, p. 103923, 2022. (RONCONI *et al.*, 2022)

RONGA, D.; BIAZZI, E.; PARATI, K.; CARMINATI, D.; CARMINATI, E.; & TAVA, A. Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. **Agronomy**, v. 9, n. 4, p. 192, 2019.

ROSSAINT, R., BOUILLON, B., CERNY, V. *ET AL*. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition. **Crit Care** 20, 100 (2016).

SANG, Y.; ROEST, M.; DE LAAT, B.; DE GROOT, P. G.; & HUSKENS, D. Interplay between platelets and coagulation. **Blood reviews**, v. 46, p. 100733, 2021.

SANG, Y.; ROEST, M.; DE LAAT, B.; DE GROOT, P. G.; & HUSKENS, D. Interplay between platelets and coagulation. **Blood reviews**, v. 46, p. 100733, 2021.

SANTIAGO-MORALES, I.S.; TRUJILLO-VALLE, L.; MÁRQUEZ-ROCHA, F.J.; & HERNÁNDEZ, J.F.L. Tocoferóis, ficocianina e superóxido dismutase de microalgas: como potenciais antioxidantes alimentares. **Biotechnologia Alimentar Aplicada**, v. 5, n. 1, pág. 19-27, 2018.

SANTOS A.M.R; MOURA M.E.B; NUNES B.M.V.T; LEAL C.F.S; TELES J.B.M. Perfil das vítimas de trauma por acidente de moto atendidas em um serviço público de emergência. *Cad saúde pública*. 2008;24(8):1927-38.

SANTOS JR, Júlio César M. Hemorragia maciça do intestino grosso: o que está ao nosso alcance?. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 30, p. 241-248, 2010.

SATYAM, Abhigyan *et al*. Complement and coagulation cascades in trauma. **Acute medicine & surgery**, v. 6, n. 4, p. 329-335, 2019.

SAUAIA, A., MOORE, F. A., MOORE, E. E., MOSER, K. S., BRENNAN, R., READ, R. A., & PONS, P. T. *et al*. Epidemiology of trauma deaths: a reassessment. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, v. 38, n. 2, p. 185-193, 1995.

SCHURGERS, L. J. *et al*. Nutritional Intake of Vitamins K1 (Phylloquinone) and K2 (Menaquinone) in The Netherlands. **Journal of Nutritional & Environmental Medicine**, v. 9, n. 2, p. 115–122, 1 jan. 1999.

SCHURGERS, L. J.; VERMEER, C. Determination of phyloquinone and menaquinones in food. Effect of food matrix on circulating vitamin K concentrations. **Haemostasis**, v. 30, n. 6, p. 298–307, 2000.

SERGEEVA, Y. E.; ZAKHAREVICH, A. A.; SUKHINOV, D. V.; KOSHKALDA, A. I.; KRYUKOVA, M. V.; MALAKHOV, S. N.; & GRIGORIEV, T. E. Chitosan Sponges for Efficient Accumulation and Controlled Release of C-Phycocyanin. **BioTech**, v. 12, n. 3, p. 55, 2023.

SHAHIDI, F.; PINAFFI-LANGLEY, A. C. C.; FUENTES, J.; SPEISKY, H.; & DE CAMARGO, A. C. Vitamin E as an essential micronutrient for human health: Common, novel, and unexplored dietary sources. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 176, p. 312-321, 2021. (SHAHIDI *et al.*, 2021).

SHANDER, A.; HARDY, J. F.; OZAWA, S.; FARMER, S. L.; HOFMANN, A.; FRANK, S. M., & FREEDMAN, J. A global definition of patient blood management. **Anesthesia & Analgesia**, v. 135, n. 3, p. 476-488, 2022.

SHEARER, M. J.; BACH, A.; KOHLMEIER, M. Chemistry, nutritional sources, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health. **The Journal of Nutrition**, v. 126, n. 4 Suppl, p. 1181S–6S, abr. 1996.

SHU, H.; WU, C.; KANG, Y.; TING-WU, L.; CHEN, L.I.; CHUAN-LIANG, C. Preparation of rapid expansion alginate/silica fiber composite scaffold and application of rapid hemostatic function. *J. Mater. Eng.*, v. 47, p. 124–129, 2019.

SIERRA, Cristina; MORENO, Maite; GARCÍA-RUIZ, Juan C. The physiology of hemostasis. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 33, n. Supplement 1, p. S1-S2, 2022.

SINTRA, T.E.; BAGAGEM, S.S.; AHSAIE, F.G., FERNANDES, A., MARTINS, M., MACÁRIO, I.P.; & VENTURA, S.P. Sequential recovery of C-phycocyanin and chlorophylls from *Anabaena cylindrica*. **Separation and Purification Technology**, v. 255, p. 117538, 2021.

SONG, Y.; LI, S.; CHEN, H.; HAN, X.; DUNS, G.J.; DESSIE, W.; & LUO, X. Kaolin-loaded carboxymethyl chitosan/sodium alginate composite sponges for rapid hemostasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 233, p. 123532, 2023.

SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S.; & BAREDAR, P. Food supplements formulated with Spirulina. **Algae: Multifarious Applications for a Sustainable World**, p. 201-226, 2021.

SPICER, Christopher D. Hydrogel ESPONJAS for tissue engineering: The importance of polymer choice. **Polymer Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 184-219, 2020.

STRIETH, D.; STIEFELMAIER, J.; WRABL, B.; SCHWING, J.; SCHMECKEBIER, A.; DI

SUMI, H. Accumulation of Vitamin K (Menaquinone-7) in Plasma after Ingestion of Natto and Natto Bacilli (*B. subtilis natto*). **Food Science and Technology Research**, v. 5, n. 1, p. 48–50, 1999.

SUN, L.; SHEN, Y.; LI, M.; WANG, Q.; LI, R.; & GONG, S. Preparation and Modification of Collagen/Sodium Alginate-Based Biomedical Materials and Their Characteristics. **Polymers**, v. 16, n. 2, p. 171, 2024.

SUPPLY, A. R. and. *Algae Culture Nannochloropsis*. 2017.

TANAKA, Kenichi A.; KEY, Nigel S.; LEVY, Jerrold H. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. **Anesthesia & Analgesia**, v. 108, n. 5, p. 1433-1446, 2009.

TARENTO, T. D.; MCCLURE, D. D.; DEGHANI, F.; & KAVANAGH, J. M. Pilot-scale production of phylloquinone (vitamin K1) using a bubble column photo-bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 150, p. 107243, 2019.

TAVANANDI, H. A.; MITTAL, R.; CHANDRASEKHAR, J.; & RAGHAVARAO, K. S. M. S. Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthospira platensis*. **Algal research**, v. 31, p. 239-251, 2018.

TEKAY, E.; AYDINOĞLU, D.; ŞEN, S. Effective adsorption of Cr (VI) by high strength chitosan/montmorillonite composite hydrogels involving spirulina biomass/microalgae. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 27, n. 8, p. 1828-1842, 2019.

THEIVANDRAN, G.; IBRAHIM, S. M.; MURUGAN, M. Fourier transform infrared (Ft-Ir) spectroscopic analysis of *Spirulina fusiformis*. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 3, n. 4, p. 30-32, 2015.

TREAGER, Christopher *et al.* A comparison of efficacy, efficiency, and durability in novel tourniquet designs. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 91, n. 2S, p. S139-S145, 2021.

VEERABADHRAN, M.; NATESAN, S.; MUBARAKALI, D.; XU, S.; & YANG, F. Using different cultivation strategies and methods for the production of microalgal biomass as a raw material for the generation of bioproducts. **Chemosphere**, v. 285, p. 131436, 2021.

VINE, Andrew K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina**, v. 29, n. 1, p. 1-7, 2009.

VOLKMAN, John K. Sterols in microalgae. **The physiology of microalgae**, p. 485-505, 2016.

WANG, C.; NIU, H.; MA, X.; HONG, H.; YUAN, Y.; & LIU, C. Bioinspired, injectable, quaternized hydroxyethyl cellulose composite hydrogel coordinated by mesocellular silica foam for rapid, noncompressible hemostasis and wound healing. **ACS applied materials & interfaces**, v. 11, n. 38, p. 34595-34608, 2019.

WARNER, Anne H.; BRADLEY, Kevin M. Extraperitoneal Rectal Injury: Colostomy, Presacral Drains. **Operative Techniques in Trauma and Critical Care**, 2023. (WARNER; BRADLEY, 2023).

WENTE, Moritz N. *et al.* Postpancreatectomy hemorrhage (PPH)—an international study group of pancreatic surgery (ISGPS) definition. **surgery**, v. 142, n. 1, p. 20-25, 2007.

WEYH, C.; KRÜGER, K.; PEELING, P.; & CASTELL, L. The role of minerals in the optimal functioning of the immune system. **Nutrients**, v. 14, n. 3, p. 644, 2022. (WEYH *et al.*, 2022)

YANOVSKA, A.; HUSAK, Y.; KORNIIENKO, V.; HOLUBNYCHA, V.; MISHCHENKO, O.; BANASIUK, R.; & POGORIELOV, M. Development, characterization and antimicrobial properties of silver nanoparticles loaded chitosan-alginate sponges for biomedical application. **Journal of Materials Research**, v. 36, n. 16, p. 3267-3277, 2021.

YONG, J.; TOH, C. Rethinking Coagulation: From enzymatic cascade and cell-based reactions to a convergent model involving innate immune activation. **Blood**, 2023.

YORDANOVA, P. N.; BORISLAVOVA, P. K.; IVANOVA, B. M.; NIKOLAEV, P. D.; & TZANEVA, G. B. The new face of vitamin K—more than blood clotting factor. **Нефрология**, v. 22, n. 1, p. 29-37, 2018.

YU, Y.; HOU, X.; YU, Q.; HUO, Y.; WANG, K.; WEN, X.; E WANG, Z. A novel two-stage culture strategy to enhance the C-phycoerythrin productivity and purity of *Arthrospira platensis*. **LWT**, v. 184, p. 115010, 2023.

ZAFREN, K. Nonfreezing cold injury (trench foot). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 19, p. 10482, 2021. (ZAFREN, 2021)

ZANELLA, Lourenço; VIANELLO, Fábio. Microalgas do gênero *Nannochloropsis*: Composição química e implicações funcionais para a nutrição humana. **Revista de Alimentos Funcionais**, v. 68, p. 103919, 2020.

Zhang, Y., Bala, V., Mao, Z., Chhonker, Y. S., & Murry, D. J. *et al.* A concise review of quantification methods for determination of vitamin K in various biological matrices. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 169, p. 133-141, 2019.

ZHANG, Z.; KUANG, G.; ZONG, S.; LIU, S.; XIAO, H.; CHEN, X.; & HUANG, Y. Sandwich-Like Fibers/Sponge Composite Combining Chemotherapy and Hemostasis for Efficient Postoperative Prevention of Tumor Recurrence and Metastasis. **Advanced Materials**, v. 30, n. 49, p. 1803217, 2018.

ZHAO, Yi-Fan *et al.* Poli (álcool vinílico)-quitosana sintética como um novo tipo de esponja hemostática altamente eficiente com inchaço desencadeado pelo sangue e alta biocompatibilidade. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 11, p. 1855-1866, 2019.

ZUCKER, Marjorie B. Platelet agglutination and vasoconstriction as factors in spontaneous hemostasis in normal, thrombocytopenic, heparinized and hypoprothrombinemic rats. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 148, n. 2, p. 275-288, 1947.

ANEXO I – APROVAÇÃO DO CEUA



UNIVERSIDADE TIRADENTES
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

PROPOSTA DO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

FORMULÁRIO DE PARECER CONSUBSTANCIADO

Proposta nº: 020123R	Data de Entrada: 06/03/23	Data do Parecer: 10/03/23
----------------------	---------------------------	---------------------------

Registro de Aprovação nº: 020123RA

Proponente Responsável: Juliana Cordeiro Cardoso
--

Instituição/Setor: Universidade Tiradentes – Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente
--

Título da Proposta: Desenvolvimento de uma esponja hemostática à base de biopolímeros e compostos bioativos lipossolúveis Observação:
--

Período de vigência da autorização	01/04/2023 a 30/07/2024
------------------------------------	-------------------------

1- Equipe envolvida no projeto/experimento:

(X) De acordo () Pendência

Observação:

2- Qualificação do(s) executor (es):

(X) De acordo () Pendência

Observação:

3- Resumo do projeto:

(X) De acordo () Pendência

Observação:

4- Objetivos do projeto:

(X) De acordo () Pendência

Observação:

5- Justificativa do projeto:

(X) De acordo () Pendência

Observação:

UNIVERSIDADE TIRADENTES
AV. MURILO DANTAS N° 300 B. FAROLÂNDIA
CEP: 49.032-490 | ARACAJU - SE - BRASIL

TELEFONE: (79) 3218 2206
FAX: (79) 3218 21 00

Prof.ª Maria Júlia Nardelli
UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT
Prof.ª Dra. Maria Júlia Nardelli
CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL
COORDENADORA
CRMV/SE 00752