

HELYN PRISCILA DE OLIVEIRA BARDDAL

SULFATAÇÃO QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DE EXSUDATO DE
Vochysia thyrsoidea E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTICOAGULANTE E
ANTITROMBÓTICA

CURITIBA
2015

HELYN PRISCILA DE OLIVEIRA BARDDAL

SULFATAÇÃO QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DE EXSUDATO DE
Vochysia thyrsoidea E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTICOAGULANTE E
ANTITROMBÓTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Helena Grachen

CURITIBA
2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Barddal, Helyn Priscila de Oliveira

Sulfatação química do polissacarídeo da goma de exsudato de *Vochysia thyrsoidea* e avaliação das atividades anticoagulante e antitrombótica./ Helyn Priscila de Oliveira Barddal. – Curitiba, 2015.

97f.: il. ; 30cm.

Orientador: Thales Ricardo Cipriani

Coorientadora: Ana Helena Grachen

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. . Anticoagulantes. 2. Heparina. 3. Polissacarídeos. I. Título II. Cipriani, Thales Ricardo. III. Grachen, Ana Helena. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

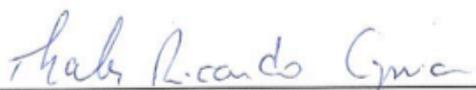
CDD (20. ed.) 574.192

TERMO DE APROVAÇÃO

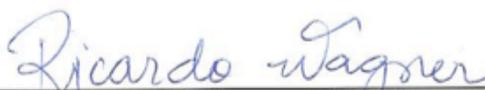
HELYN PRISCILA DE OLIVERIA BARDDAL

Sulfatação química do polissacarídeo da goma de exsudato de *Vochysia thyrsoidea* e avaliação das atividades anticoagulante e antitrombótica

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani - Orientador
Departamento de Bioquímica – UFPR



Prof. Dr. Ricardo Wagner
Departamento de Análises Clínicas - UFPR



Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti
Departamento de Bioquímica – UFPR

Curitiba, 18 de março de 2015.

Dedico esse trabalho aos meus pais que depositaram, em mim e em meus irmãos, toda energia, confiança e a credibilidade de uma vida melhor proveniente dos estudos e que deixaram de aproveitar muitos momentos a dois para nos amparar durante as intempéries encontradas até aqui. Guerreiros são vocês, somos apenas bons frutos de suas batalhas vencidas.

RESUMO

A heparina é um glicosaminoglicano altamente sulfatado que tem grande importância clínica como agente anticoagulante e antitrombótico, principalmente, por se ligar à antitrombina (AT) e ao cofator II da heparina (HCII), acelerando a taxa com que estes inibidores de serino proteases inativam enzimas da coagulação, como a α -trombina e o fator Xa. Embora eficaz, a heparina pode causar, entre outros efeitos adversos, sangramento e trombocitopenia, além de ser obtida a partir do intestino suíno e pulmão bovino, gerando grande preocupação com contaminação por patógenos animais. Na busca por agentes anticoagulantes e antitrombóticos alternativos à heparina e de origem não animal, uma glicoglucuronomanana extraída da goma de exsudato de *Vochysia thyrsoidea* (VTh; $M_W = 92.500$ g/mol) foi hidrolisada (Ph-VTh; $M_W = 58.250$ g/mol) e quimicamente sulfatada (VThS e Ph-VThS). O grau de substituição por grupos sulfato (DS) foi determinado para VThS (0,20) e Ph-VThS (0,24). Esses baixos valores de DS resultaram em pouca diferença nos espectros de RMN dos polissacarídeos antes e após a sulfatação. A análise de metilação indicou que a sulfatação ocorreu, preferencialmente, na posição O-5 de unidades de arabinose no polissacarídeo nativo, e na posição O-6 de unidades de manose no polissacarídeo hidrolisado. Teste de aPTT mostrou que os polissacarídeos sulfatados apresentam atividade anticoagulante (8,59 UI/mg – VThS e 2,67 UI/mg – Ph-VThS), e que esta atividade pode ser inibida por protamina. Na avaliação do mecanismo de anticoagulação, VThS e Ph-VThS mostraram uma resposta do tipo serpino-dependente, conseguindo inibir a α -trombina e o fator Xa apenas na presença de AT e HCII. No modelo *in vivo* de trombose venosa, VThS e Ph-VThS reduziram a formação do trombo em aproximadamente 50%, na dose de 40 UI/kg, alcançando resultados estatisticamente similares aos da heparina em todas as concentrações testadas. A administração dos polissacarídeos em ratos por via subcutânea, seguida de avaliação do aPTT 2 e 3 VTh após, mostrou que Ph-VThS é absorvido por esta via e que o efeito anticoagulante diminuiu da segunda para a terceira hora, sugerindo sua biodegradação e/ou excreção. Os resultados obtidos demonstram que os polissacarídeos obtidos a partir da goma de exsudato de *V. thyrsoidea*, quando sulfatados, são promissores agentes anticoagulantes e antitrombóticos.

Palavras chave: Glicoglucuronogmanana, sulfatação química, atividade anticoagulante, atividade antitrombótica.

ABSTRACT

Heparin is a highly sulfated glycosaminoglycan that has great clinical importance as an anticoagulant and antithrombotic agent, mainly by binding to antithrombin (AT) and heparin cofactor II (HCII), accelerating the rate at which these inhibitors of serine proteases inactivate enzymes of the coagulation cascade, such as α -thrombin and factor Xa. Although effective, heparin can cause, among other adverse effects, bleeding and thrombocytopenia, as well as being obtained from bovine lungs and porcine intestines, generating great concern about contamination with animal pathogens. In the search for anticoagulant and antithrombotic agents from a non-animal source, as alternatives to heparin, a glycolglucuronomannan from the gum exudate of *Vochysia thyrsoidea* (VTh; $M_w = 92,500$ g/mol) was hydrolyzed (Ph-VTh; $M_w = 58,250$ g/mol) and chemically sulfated (VThS and Ph-VThS). The degree of substitution (DS) was determined for VThS (0.20) and Ph-VThS (0.24). These low DS values resulted in little differences in the NMR spectra of the polysaccharides before and after sulfation. Methylation analysis indicated that sulfation occurred preferentially at the O-5 position of arabinose units in the native polysaccharide, and at the O-6 position of mannose units in the hydrolyzed polysaccharide. aPTT test showed that sulfated polysaccharides have anticoagulant activity (8.59 IU/mg – VThS and 2.67 IU/mg – Ph-VThS), and this activity can be inhibited by protamine. In the evaluation of anticoagulation mechanism, VThS and Ph-VThS showed a serpin-dependent response, inhibiting α -thrombin and factor Xa only in the presence of AT and HCII. In *in vivo* model of venous thrombosis, VThS and Ph-VThS reduced thrombus formation approximately 50% at a dose of 40 IU/kg, reaching statistically similar results to heparin in all concentrations tested. The administration of the polysaccharides in rats by subcutaneous route, followed by aPTT evaluation 2 and 3 hours later, showed that Ph-VThS is absorbed by this route and that the anticoagulant effect decreased from the second to the third hour, suggesting their degradation and/or excretion. The results showed that polysaccharides obtained from the gum exudate of *V. thyrsoidea*, when sulfated, are promising anticoagulant and antithrombotic agents.

Keywords: Glycolglucuronomannan, chemical sulfation, anticoagulant activity, antithrombotic activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -HEMOSTASIA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA	20
FIGURA 2 -MODELO CLÁSSICO DE HEMOSTASIA.....	24
FIGURA 3 -MODELO DE HEMOSTASIA BASEADO NA CÉLULA.....	27
FIGURA 4 -VISÃO GERAL DOS TESTES DE COAGULAÇÃO.....	31
FIGURA 5 -TROMBOSE ARTERIAL E VENOSA.....	33
FIGURA 6 -ESTRUTURA DAS UNIDADES MAJORITÁRIAS E MINORITÁRIAS DA HEPARINA.....	37
FIGURA 7 -SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DE LIGAÇÃO DA HEPARINA À ANTITROMBINA	38
FIGURA 8 - <i>Vochysia thyrsoidea</i>	45
FIGURA 9 -ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	48
FIGURA 10 -PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC DOS POLISSACARÍDEOS NATIVO (VTh) E HIDROLISADO (Ph-VTh) DE <i>V. thyrsoidea</i> , UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO	61
FIGURA 11 -ESPECTROS DE HSQC-editado DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS NATIVA (VTh) (A) E HIDROLISADA (Ph-VTh) (B) DA GOMA DE EXSUDATO DE <i>V. thyrsoidea</i>	62
FIGURA 12 -PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC DOS POLISSACARÍDEOS VTh E Ph-VTh (A) E VThS E Ph-VThS (B), UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI)	66
FIGURA 13 -ESPECTROS DE HSQC-editado DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS QUIMICAMENTE SULFATADAS E NÃO SULFATADAS DA GOMA DE EXSUDATO DE <i>V. thyrsoidea</i>	69
FIGURA 14 -CURVA DE CALIBRAÇÃO DE HEPARINA, PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE	72
FIGURA 15 -ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE POR PROTAMINA.....	75
FIGURA 16 -EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS NA INIBIÇÃO DA α -TROMBINA E FATOR Xa NA PRESENÇA DE AT OU HCII.....	77
FIGURA 17 -EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS NA INIBIÇÃO DA α -TROMBINA (A) E FATOR Xa (B) NA AUSÊNCIA DE AT OU HCII	78

FIGURA 18 -EFEITO ANTITROMBÓTICO <i>IN VIVO</i> DOS POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS	80
FIGURA 19 -EFEITO NA COAGULAÇÃO DO PLASMA DE RATOS, 2 E 3 HORAS APÓS INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DOS POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FATORES DE COAGULAÇÃO.....	22
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NATIVA E HIDROLISADA OBTIDAS DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DE EXSUDATO DE <i>V. thyrsoidea</i>	60
TABELA 3 - RENDIMENTO E DS DOS POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS	65
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES SULFATADAS OBTIDAS A PARTIR DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DE EXSUDATO DE <i>V. thyrsoidea</i>	68
TABELA 5 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES CARBOXIRREDUZIDAS NÃO SULFATADAS E SULFATADAS OBTIDAS A PARTIR DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DE EXSUDATO DE <i>V. thyrsoidea</i>	71
TABELA 6 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DE <i>V. thyrsoidea</i>	73

LISTA DE SIGLAS E TERMOS

ADP	- Adenosina difosfato
ANOVA	- <i>Analysis of variance</i> (análise de variância)
aPTT	- <i>Activated partial thromboplastin time</i> (tempo de protrombina parcial ativada)
Araf	- Arabinose furanosídica
Arap	- Arabinose piranosídica
AT	- Antitrombina
C	- Carbono
Ca ⁺⁺	- Cálcio
CaCl ₂	- Cloreto de cálcio
CH ₃ I	- Iodeto de metila
CR ₃ VTh	- Polissacarídeo nativo carboxirreduzido
CuSO ₄	- Sulfato de cobre
D ₂ O	- Água deuterada
DMSO	- <i>Dimethyl sulfoxide</i> (dimetilsulfóxido)
<i>dn/dc</i>	- <i>Specific refractive index increment</i> (índice de refração específico)
DS	- <i>Degree of substitution</i> (grau de substituição)
EDTA	- <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilenodiaminotetracético)
EP	- Embolia pulmonar
EPCR	- <i>Endothelial PC receptor</i> (receptor endotelial de PC)
EPM	- Erro-padrão médio
EUA	- <i>United States of America</i> (Estados Unidos da América)
FP3	- Fator plaquetário 3
Galp	- Galactose piranosídica
GC-MS	- <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas)
GlcA	- Ácido glucurônico
GlcN	- Glucosamina
GlcNAc	- Glucosamina acetilada
GlcNSO ₃	- Glucosamina sulfatada

Glc _p	- Glucose piranosídica
H ₂ SO ₄	- Ácido sulfúrico
HClI	- Cofator II de heparina
HCl	- Ácido clorídrico
HMWK	- <i>High molecular weight kininogen</i> (cininogênio de alto peso molecular)
HPSEC	- <i>High pressure size exclusion chromatography</i> - (cromatografia de exclusão estérica)
HSO ₃ Cl	- Ácido clorossulfônico
HSQC	- <i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
IdoA	- Ácido idurônico
kDa	- Kilo Daltons
LMWH	- <i>Low molecular weight heparin</i> (heparina de baixo peso molecular)
Man _p	- Manose piranosídica
MES	- Ácido 2-(N-morfolina)-etanosulfônico
M _w	- Massa molar
Na ₂ SO ₄	- Sulfato de sódio
NaBD ₄	- Boroidreto de sódio deuterado
NaBH ₄	- Boroidreto de sódio
NaHCO ₃	- Bicarbonato de sódio
NaN ₃	- Azida de sódio
NaNO ₂	- Nitrito de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
OH	- Hidroxila
p/v	- Peso/volume
PAI - I	- <i>Plasminogen activator inhibitor - I</i> (inibidor do ativador do plasminogênio - I)
PBS	- <i>Phosphate buffered saline</i> (tampão de fosfato salina)
PC	- Proteína C
Ph-VTh	- Polissacarídeo hidrolisado
Ph-VTh-CR	- Polissacarídeo hidrolisado carboxirreduzido
Ph-VThS	- Polissacarídeo hidrolisado quimicamente sulfatado

Ph-VThSCR ₂	- Polissacarídeo hidrolisado quimicamente sulfatado e carboxirreduzido
PS	- Proteína S
PT	- <i>Prothrombin time</i> (tempo de protrombina)
RMN	- <i>Nuclear magnetic resonance</i> (ressonância magnética nuclear)
SO ₃	- Trióxido de enxofre
TEV	- Tromboembolismo venoso
TF	- <i>Tissue factor</i> (fator tissular)
TFA	- <i>Trifluoroacetic acid</i> (ácido trifluoracético)
TFPI	- <i>Tissue factor pathway inhibitor</i> (inibidor da via do fator tissular)
tPA	- <i>Tissue type plasminogen activator</i> (ativador de plasminogênio tecidual)
TRIS	- Tris (hidroximetil) aminometano
TT	- <i>Thrombin time</i> (tempo de trombina)
TVP	- Trombose venosa profunda
UFH	- <i>Unfractionated heparin</i> (heparina não fracionada)
UI	- Unidades Internacionais
uPA	- <i>Urokinase type plasminogen activator</i> (ativador de plasminogênio do tipo uroquinase)
VTh	- Polissacarídeo nativo
H ⁺	- Próton
VThS	- Polissacarídeo nativo quimicamente sulfatado
VThSCR ₂	- Polissacarídeo nativo quimicamente sulfatado e carboxirreduzido
vWF	- <i>von Willebrand factor</i> (fator de von Willebrand)
Xylp	- Xilose piranosídica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 HEMOSTASIA.....	19
2.1.1 Modelo Clássico da Coagulação Sanguínea	21
2.1.1.1 Via Extrínseca	22
2.1.1.1 Via Intrínseca	23
2.1.1.2 Via Comum.....	23
2.1.2 Modelo de Hemostasia Baseado na Célula	24
2.1.2.1 Fase de Iniciação	25
2.1.2.2 Fase de Amplificação	26
2.1.2.3 Fase de Propagação	26
2.1.3 Sistema Anticoagulante.....	27
2.1.3.1 Antitrombina	27
2.1.3.2 Cofator II da Heparina	28
2.1.3.3 Proteína C (PC) e Proteína S (PS).....	28
2.1.3.4 Inibidor da Via do Fator Tissular	29
2.1.3.5 Fibrinólise	29
2.2 COAGULAÇÃO <i>IN VITRO</i>	30
2.3 DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS.....	31
2.3.1 Trombose Arterial.....	32
2.3.2 Tromboembolismo Venoso	32
2.4 AGENTES ANTICOAGULANTES E ANTITROMBÓTICOS	34
2.4.1 Anticoagulantes Naturais	34
2.4.2 Anticoagulantes Orais	35
2.4.3 Anticoagulantes Parenterais	36
2.4.3.1 Heparina.....	36
2.4.3.1.1 Mecanismo de Ação da Heparina	37
2.4.3.1.2 Limitações do Uso da Heparina	38
2.4.3.2 Heparina de Baixa Massa Molecular.....	39
2.5 PROTAMINA	40
2.6 ESTUDOS ALTERNATIVOS À HEPARINA.....	40

2.7 <i>Vochysia thyrsoidea</i>	44
3 JUSTIFICATIVA	46
4 OBJETIVOS	47
5 MATERIAL E MÉTODOS	48
5.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	48
5.2 MATERIAL DE ESTUDO	48
5.3 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO	49
5.3.1 Hidrólise Ácida Parcial	49
5.3.2 Sulfatação Química	49
5.4 ANÁLISE ESTRUTURAL	50
5.4.1 Composição Monossacarídica	50
5.4.2 Análise de Homogeneidade	50
5.4.3 Determinação da Massa Molar	51
5.4.4 Dosagem de Ácidos Urônicos	51
5.4.5 Carboxirredução	52
5.4.6 Análise de Metilação	52
5.4.7 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)	53
5.4.8 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	54
5.4.9 Determinação do Grau de Substituição por Grupos Sulfato (DS).....	54
5.5 ANÁLISES <i>IN VITRO</i>	55
5.5.1 Determinação da Potência Anticoagulante dos Polissacarídeos	55
5.5.2 Ensaio de Inibição da Atividade Anticoagulante dos Polissacarídeos com Protamina	56
5.5.3 Ensaio de Inibição de α -Trombina ou Fator Xa	56
5.6 ANÁLISES <i>IN VIVO</i>	57
5.6.1 Animais.....	57
5.6.2 Análise da Atividade Antitrombótica: Modelo de Trombose Venosa Estase-Induzida em Ratos	57
5.6.3 aPTT <i>Ex Vivo</i>	58
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1 ANÁLISE ESTRUTURAL DO POLISSACARÍDEO NATIVO E HIDROLISADO PARCIALMENTE	59

6.1.1 Análise da Homogeneidade, Cálculo da Massa Molar (M_w) e Composição Monossacarídica	59
6.1.2 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	61
6.2 POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS	63
6.2.1 Processo de Sulfatação Química e Determinação do Grau de Substituição (DS)	63
6.3 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS	65
6.3.1 Análise da Homogeneidade	65
6.3.2 Composição Monossacarídica e Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	67
6.3.3 Análise de Metilação	69
6.4 ANÁLISES <i>IN VITRO</i>	72
6.4.1 Determinação da Potência Anticoagulante dos Polissacarídeos	72
6.4.2 Ensaio de Inibição da Atividade Anticoagulante dos Polissacarídeos com Protamina	74
6.4.3 Determinação do Mecanismo de Ação Anticoagulante.....	75
6.4.3.1 Ensaio de Inibição da α -Trombina e Fator Xa na Presença de AT OU HCII	75
6.4.3.2 Ensaio de Inibição da α -Trombina e Fator Xa na Ausência de AT OU HCII.	78
6.5 ANÁLISES <i>IN VIVO</i>	79
6.5.1 Análise da Atividade Antitrombótica: modelo de trombose venosa estase-induzida em ratos	80
6.5.2 aPTT <i>Ex Vivo</i>	82
7 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	86
ANEXO	97

1 INTRODUÇÃO

A ativação de uma cascata de coagulação sanguínea tem por consequência a produção de trombina e formação de coágulo com sua posterior dissolução. Esse processo fisiológico que envolve a coagulação sanguínea e sua interrupção é conhecido como hemostasia, sendo que o desequilíbrio neste processo é a origem de muitas doenças isquêmicas e hemorrágicas (GRACHER *et al.*, 2010).

A heparina é largamente utilizada como um agente anticoagulante e antitrombótico, principalmente, por se ligar aos fatores de coagulação sanguínea como a antitrombina (AT) e ao cofator II da heparina (HCII), acelerando a taxa com que estes inibidores de proteases formam complexos com enzimas envolvidas na coagulação, especialmente α -trombina e fator Xa, inativando-as (CASU, 1985; BOURIN; LINDAHL, 1993). Ela é um glicosaminoglicano constituído principalmente por unidades de glucosamina (*N*-acetilada ou *N*-sulfatada) e ácido urônico (idurônico ou glucurônico) unidas por ligações glicosídicas 1→4, apresentando um complexo padrão de substituição por grupos sulfato (CASU, 1985; MOURÃO; PEREIRA, 1999).

Embora eficaz, a utilização da heparina tem limitações, uma vez que seu efeito anticoagulante é imprevisível, gerando risco de sangramento, necessitando de monitoramento laboratorial do paciente para um uso seguro. Além disso, uma vez que ela é extraída de tecidos animais, principalmente do intestino de porco e do pulmão bovino, há uma grande preocupação em relação à sua possível contaminação por patógenos animais (PERRINAUD *et al.*, 2006; MAAS *et al.*, 2012). Por estas razões, muitos estudos buscam a obtenção de agentes anticoagulantes e antitrombóticos alternativos à heparina, destacando-se aqueles com polissacarídeos naturalmente ou quimicamente sulfatados (MOURÃO; PEREIRA, 1999; MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005; POMIN, 2009; CIPRIANI *et al.*, 2009; GRACHER *et al.*, 2010; MAAS *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2013). Ambos os efeitos anticoagulante e antitrombótico estão relacionados à presença de grupos sulfato, suas posições e distribuição ao longo da cadeia do polissacarídeo. Além disso, estes efeitos são influenciadas pelo tipo e estereoquímica dos monossacarídeo que constituem o polissacarídeo, e pelo tipo ligação glicosídica que os une (POMIN, 2009).

Sendo assim, este trabalho busca a obtenção de polissacarídeos quimicamente sulfatados de origem vegetal, obtidos a partir da goma de exsudato de *Vochysia thyrsoidea*, que possam atuar como alternativas à heparina não fracionada e à heparina de baixa massa molecular, como drogas anticoagulantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HEMOSTASIA

A hemostasia é um processo fisiológico pelo qual o organismo tenta equilibrar os processos de perda sanguínea e de formação de coágulo, por meio da ação de substâncias anticoagulantes e pró-coagulantes endógenas. Na visão de Vine (2009), hemostasia se refere ao processo fisiológico que controla a fluidez do sangue e tem o potencial para induzir rapidamente um tampão hemostático, uma massa rica em plaquetas envolto em fibrina, do lado de fora de um vaso sanguíneo danificado, para prender o fluxo de sangue (coagulação).

A lesão vascular desencadeia a hemostasia primária e secundária e dentro disso, três importantes mecanismos de controle de perda sanguínea. Inicialmente, na hemostasia primária há a contração muscular da parede do vaso lesionado, seguida da aderência das plaquetas circulantes ao sítio da lesão (adesão plaquetária) e de outras plaquetas às já aderidas (agregação plaquetária), fenômenos que dão origem ao tampão plaquetário. Finalmente, na hemostasia secundária a coagulação do sangue permite, a partir de uma rede de fibrina, a consolidação do tampão plaquetário, com formação de tampão hemostático, como mostrado na Figura 1 (EYRE; GAMLIN, 2010; BOZZINI; MOLINAS, 2004; SMITH; DAY; MACKIN, 2005; MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

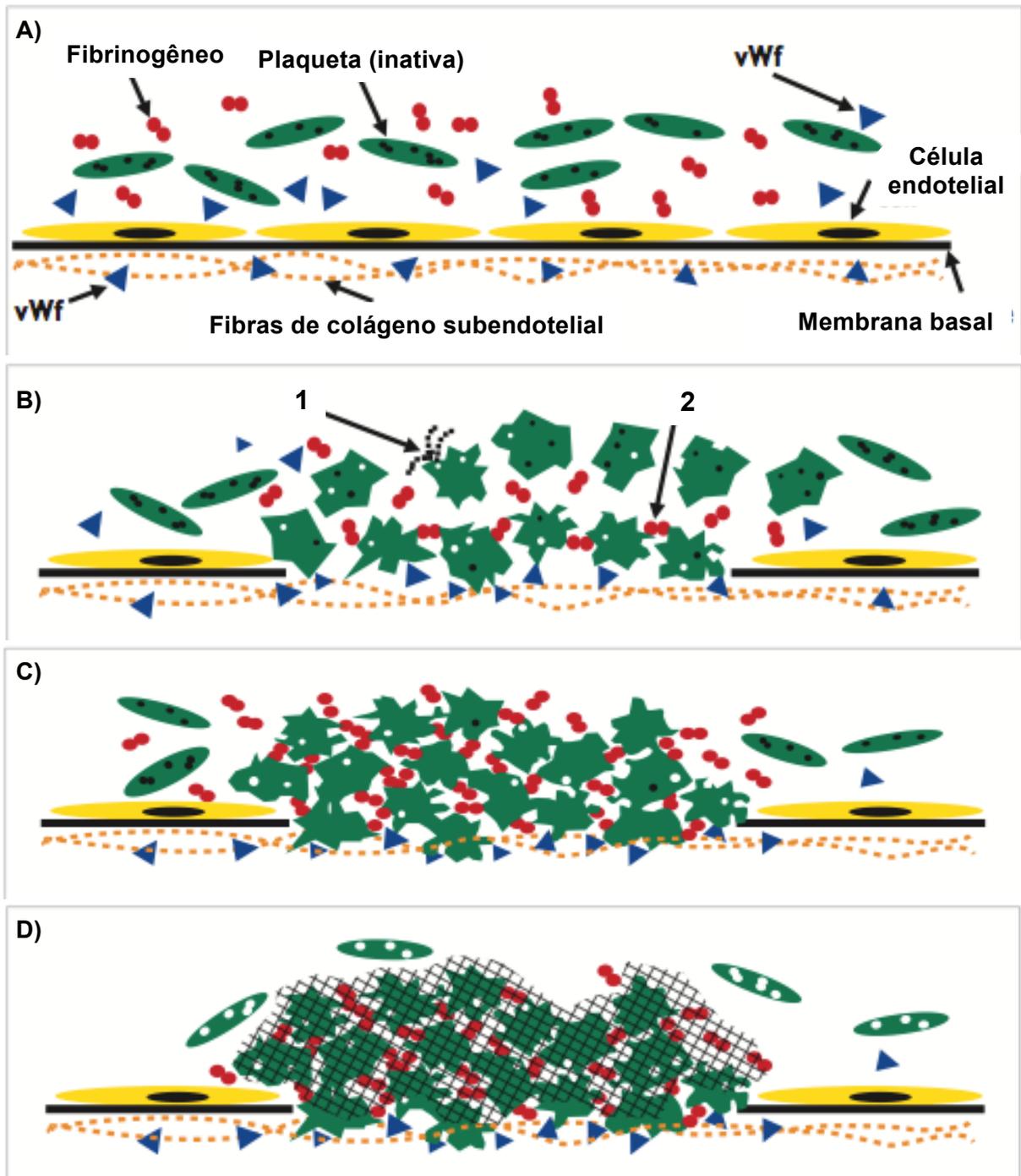


FIGURA 1 - HEMOSTASIA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA

FONTE: Adaptado de Smith, Day e Mackin (2005)

NOTAS: A) Endotélio intacto na hemostasia primária. B) Adesão plaquetária: Resposta inicial das plaquetas ao dano vascular, pela exposição às fibras de colágeno subendotelial e ao fator de von Willebrand (vWF). 1) Plaquetas modificadas secretando o conteúdo de seus grânulos (serotonina, ADP e tromboxano A₂). 2) Formação de filamentos de fibrina. C) Agregação plaquetária: Crescimento do tampão plaquetário pelo recrutamento de novas plaquetas pelas já ativadas. D) Estabilização do coágulo e consolidação da rede de fibrina formada pela ativação da trombina na hemostasia secundária

2.1.1 Modelo Clássico da Coagulação Sanguínea

A coagulação é o processo no qual o sangue perde sua característica de fluido, por meio da geração de um coágulo pela interação das plaquetas, tecido lesado e fibrina. Ela envolve uma série de reações de conversão de zimogênios em proteases ativas. Os componentes em cada estágio incluem uma protease do estágio precedente, um zimogênio, um co-fator proteico não enzimático, cálcio e uma superfície organizadora, proporcionada por uma emulsão fosfolipídica *in vitro* ou pelas plaquetas *in vivo* (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

Os fatores de coagulação são, na sua maioria, enzimas do tipo serino proteases. Muitos fatores de coagulação são, comumente, designados por algarismos romanos (Tabela 1). Para indicar sua forma ativa, convencionou-se acrescentar a letra “a” minúscula após o algarismo. O número correspondente a cada fator não reflete a ordem de sequência das reações e sim a ordem com que foram descobertos. A maioria dos fatores de coagulação se apresenta na forma inativa, denominada zimogênio, que quando ativada, provoca reações proteolíticas em cascata no processo de coagulação (GUYTON; HALL, 2006).

Em 1964, Macfarlane (1964) e Davie e Ratnoff (1964), independentemente, propuseram a hipótese da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação sanguínea. Nesse modelo existem dois mecanismos relacionados intimamente (intrínseco e extrínseco) que, quando estimulados, podem gerar fibrina a partir da ativação de fatores de coagulação capazes de ativar outros fatores de coagulação. O mecanismo intrínseco refere-se à sequência de reações enzimáticas que se inicia quando o sangue entra em contato com a superfície lesada. O mecanismo extrínseco refere-se à sequência de reações que ocorrem quando a lesão de um vaso sanguíneo resulta na liberação de extratos teciduais. Estas duas vias convergem para a ativação do fator X que, por meio de uma via comum, leva à formação de fibrina e, conseqüentemente, à coagulação (CHEN; SEIFFERT; HAWES, 2014; VOGLER; SIEDLECKI, 2009).

TABELA 1 - FATORES DE COAGULAÇÃO

Fator	Nome	Origem
I	Fibrinogênio	Fígado
II	Protrombina	Fígado
III	Fator tecidual	Tecidos em geral
IV	Íons cálcio	Tecidos em geral
V	Pró-acelerina	Fígado
VII	Pró-convertina	Fígado
VIII	Fator anti-hemofílico	Endotélio
IX	Fator Christmas	Fígado
X	Fator de Stuart	Fígado
XI	Antecedente de tromboplastina	Fígado
XII	Fator de Hageman	Fígado
XIII	Fator estabilizador da fibrina	Fígado
Proteína C		Endotélio
Proteína S		Endotélio

FONTE: Adaptado de Rand e Murray (2007)

2.1.1.1 Via Extrínseca

Conhecida também como via do fator tecidual, a via extrínseca é assim denominada pelo fato de que a substância ativadora da protrombina é gerada em resposta ao contato do sangue com tecidos extravasculares, ou seja, o fator desencadeante que facilita a coagulação não se encontra circulante no sangue, sendo este fator a tromboplastina tecidual (fator III) ou fator tissular (*tissue factor* - TF) (GRACHER, 2010). O TF é uma glicoproteína transmembrana que normalmente não é expressa em células que entram em contato com o plasma, mas quando existe injúria vascular as células que expressam o TF são expostas ao plasma.

Diferente de outros fatores envolvidos na coagulação sanguínea, o TF está sempre presente como um fator ativo (MARTINICHEN, 2005).

Após uma lesão vascular, o TF é exposto ao plasma e forma um complexo com o fator VIIa (1% do fator VII circulante encontra-se ativo), que é dependente de vitamina K. O complexo FT/VIIa converte os fatores IX e X nas suas formas ativas, reação que requer a participação de íons cálcio, conforme mostrado na Figura 2 (FRANCO, 2001, CARLOS; FREITAS, 2007, SMITH; DAY; MACKIN, 2005; MARTINICHEN, 2005).

2.1.1.1 Via Intrínseca

Essa via é também denominada de via de contato. Ela se inicia quando o sangue entra em contato com uma superfície diferente do endotélio normal e das células sanguíneas (CARLOS; FREITAS, 2007).

A exposição do sangue ao colágeno da parede vascular causa ativação de plaquetas, as quais mudam de forma, expondo fosfolipídios carregados negativamente e uma lipoproteína denominada fator plaquetário 3 (FP3) em sua superfície. Numa reação dependente de cininogênio de alto peso molecular (*high molecular weight kininogen* – HMWK) e calicreína ocorre, na superfície das plaquetas ativadas, a ativação do fator XII. Numa reação também dependente de HMWK, o fator XIIa ativa o fator XI. O fator XIa provoca a ativação do fator IX que em conjunto com o fator VIIIa e FP3 ativam o fator X, conforme mostrado na Figura 2 (FRANCO, 2001; CARLOS; FREITAS, 2007; SMITH; DAY; MACKIN, 2005).

2.1.1.2 Via Comum

Essa via se inicia com a ativação do fator X pela via intrínseca ou pela via extrínseca. O fator X ativado (FXa) combina-se com o fator V, fosfolipídios teciduais ou com fosfolipídios liberados pelas plaquetas para formar o complexo denominado ativador de protrombina, capaz de converter o fator II (protrombina) em fator IIa

(trombina), que tem como principal ação a conversão de fibrinogênio (fator I) em monômeros de fibrina. Estes últimos são interligados covalentemente por meio de uma reação catalizada pelo fator XIIIa (fator estabilizador da fibrina; uma transglutaminase), formando polímeros insolúveis de fibrina (FIGURA 2) (VOGLER; SIEDLECKI, 2009; CARLOS; FREITAS 2007). O fator XIII é ativado pela trombina.

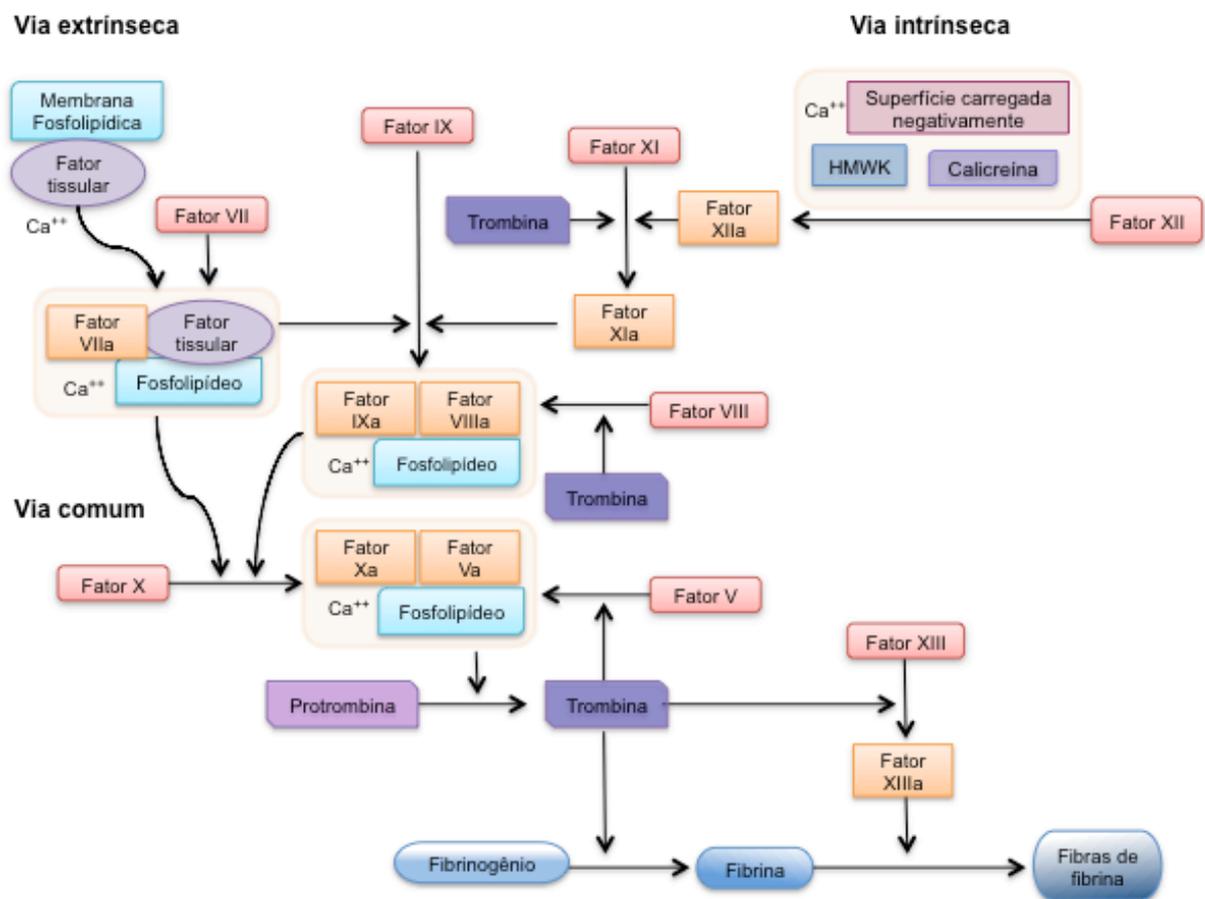


FIGURA 2 - MODELO CLÁSSICO DE HEMOSTASIA

FONTE: Adaptado de *Common Pathway of Coagulation* (2015)

NOTA: HMWK (*high molecular weight kininogen*) cininogênio de alto peso molecular

2.1.2 Modelo de Hemostasia Baseado na Célula

A descrição do modelo clássico de coagulação pelas vias intrínseca e extrínseca tem sido largamente utilizada, no entanto, atualmente ela é entendida

como inadequada do ponto de vista fisiológico da coagulação, já que elas não se compensam numa situação de deficiência de algum dos fatores, ou seja, elas ocorrem de forma dependente *in vivo* (FRANCO, 2001).

Acreditava-se que a via intrínseca tinha maior importância no processo de ativação da coagulação pois quadros hemorrágicos como hemofilias A e B eram decorrentes das deficiências dos fatores intrínsecos VIII e IX, respectivamente. No entanto, essa ideia não estava correta, já que deficiência no fator XI leva a quadro hemorrágico leve e a deficiência no fator XII não provoca hemorragia. Além disso, a deficiência no fator VII, crucial para iniciar a via extrínseca, está associada a quadro hemorrágico similar à hemofilia (EYRE; GAMLIN, 2010; VINE, 2009; FRANCO, 2001).

A explicação do motivo de que a ativação do fator X extrinsecamente não compensa a falta do fator VIII ou IX, está no modelo de hemostasia baseado na célula proposto por Hoffman e Monroe em 2001. Neste modelo a hemostasia é descrita como sobreposição de três fases: iniciação, amplificação e propagação.

2.1.2.1 Fase de Iniciação

O processo de coagulação inicia-se quando ocorre uma lesão vascular seguida da exposição de colágeno e células que expressam fator tissular. O fator VII circulante se liga rapidamente a esse TF exposto pelo dano no endotélio vascular, formando um complexo capaz de ativar o fator IX e X. O fator IXa amplifica a ativação do fator X e ajuda na ativação das plaquetas. O fator Xa liga-se à superfície celular de plaquetas ativadas presentes no local da lesão vascular e, caso se deligue, ele é imediatamente inativado pela antitrombina ou pelo inibidor da via do TF. O fator Xa liga-se ao fator V formando um complexo capaz de catalisar a formação da trombina a partir da protrombina (FIGURA 3) (NOGUEIRA, 2013; EYRE; GAMLIN, 2010; VINE, 2009).

2.1.2.2 Fase de Amplificação

Nesta fase acontece a ativação das plaquetas a partir da ligação com fibras de colágeno mediada pelo fator de von Willebrand (vWF) e por um receptor específico (glicoproteína Ia/IIa).

A trombina formada na fase de iniciação, juntamente com a pequena quantidade de plaquetas ativadas é capaz de amplificar o processo de adesão plaquetária e ativar os fatores V, VIII e XI. As plaquetas ativadas liberam fator V de seus grânulos que é então ativado pelo trombina (CATERINA *et al.*, 2013). O complexo não covalente formado pelo fator de vWF e fator VIII é clivado pela trombina liberando o vWF e gerando fator VIIIa. As plaquetas ativadas agora têm fatores Va, VIIIa, e XIa ligados às suas superfícies, como mostrado na Figura 3 (NOGUEIRA 2013; VINE 2009; FRANCO, 2001).

2.1.2.3 Fase de Propagação

Essa fase é caracterizada pela formação dos complexos tenase (fator VIIIa/IXa) e protrombinase (Xa/Va) na superfície das plaquetas ativadas.

O complexo tenase é formado quando o fator IXa se move da célula portadora do TF, onde foi ativado, para se ligar ao cálcio, fosfolípidos e ao VIIIa expresso em plaquetas ativadas. O complexo tenase ativa o fator X, que se complexa com o fator Va formando o complexo protrombinase. O complexo protrombinase associado ao FP3 produzem uma explosão de trombina, que por sua vez, converte o fibrinogênio solúvel em fibrina e ativa o fator XIII. O fator XIIIa estabiliza os monômeros de fibrina polimerizados através da introdução de ligações cruzadas entre as moléculas, formando um coágulo de fibrina hemostático (FIGURA 3) (NOGUEIRA, 2013; GRACHER, 2010; VINE, 2009; MARTINICHEN, 2005).

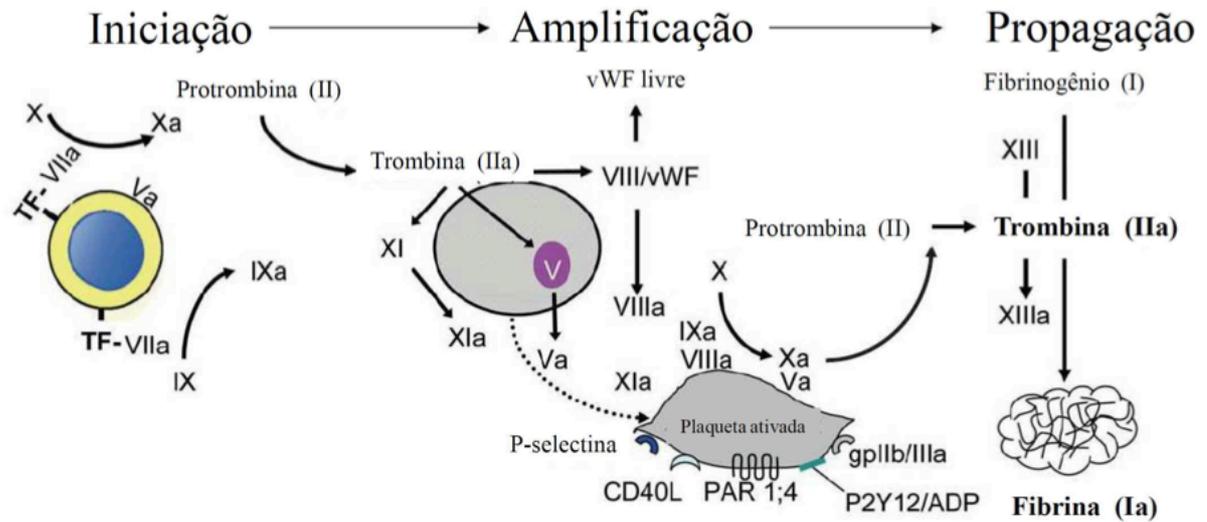


FIGURA 3 - MODELO DE HEMOSTASIA BASEADO NA CÉLULA
 FONTE: Adaptado de Caterina *et al.* (2013)

2.1.3 Sistema Anticoagulante

O organismo necessita de um controle estritamente rigoroso da hemostasia para evitar a disseminação de coágulos para áreas não lesionadas. Para manter esse equilíbrio hemostático, o corpo dispõe de mecanismos anticoagulantes naturais que atuam desde a inibição à modulação de fatores de coagulação (NOGUEIRA 2013; SMITH; DAY; MACKIN, 2005; FRANCO, 2001).

Dentre os diversos componentes do mecanismo anticoagulante, os principais são a antitrombina III, o cofator II de heparina (HCII) e o inibidor da via do fator tissular (*tissue factor pathway inhibitor* – TFPI) (FRANCO, 2001).

2.1.3.1 Antitrombina

A antitrombina (AT), antes chamada de antitrombina III, é uma proteína da família das serpinas (inibidoras de serino proteases), com 58 kDa de massa molecular, produzida no fígado. Ela circula no plasma numa concentração de 150 µg/mL e inibe primariamente a trombina, além de exercer efeito inibitório sobre os

fatores IXa, Xa e o XIa e acelerar a dissociação do complexo VIIa/TF, impedindo sua reassociação (NOGUEIRA 2013; VINE, 2009; FRANCO, 2001).

A atividade inibitória da AT é lenta, no entanto quando na presença de heparan sulfato ou heparina, sua ação é potentemente acelerada. Isso porque essa combinação causa uma modificação conformacional na AT promovendo a ligação mais específica à trombina ou às outras moléculas (FRANCO, 2001; HINSBERGH, 2001).

2.1.3.2 Cofator II da Heparina

O cofator II da heparina (HCII) também pertence à família das serpinas, mas diferente da AT, o HCII tem ação inibitória exclusivamente sobre a trombina. Ele tem aproximadamente 66 kDa, circula no plasma a uma concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$, com meia vida de 2 a 3 dias. Sua ação também é lenta, mas pode ser drasticamente aumentada na presença de heparina.

Em comparação com a AT, maiores concentrações de heparina são necessárias para ativar HCII, sendo que quando presente no plasma em concentrações terapêuticas, a heparina estimula preferencialmente a AT (TOLLEFSEN, 2007).

2.1.3.3 Proteína C (PC) e Proteína S (PS)

A proteína C é uma glicoproteína produzida pelo fígado e que possui 62 kDa de massa molecular. Ela circula no plasma humano na forma de zimogênio em concentração de aproximadamente 4 $\mu\text{g/mL}$ (NOGUEIRA, 2013). Quando ligada ao seu receptor no endotélio (EPCR – *endothelial PC receptor*) e ao complexo formado entre a trombina e trombomodulina (uma proteína endotelial), a proteína C é ativada (PCa) (FRANCO, 2001; SMITH; DAY; MACKIN, 2005). No entanto, para exercer função anticoagulante ela deve se dissociar do EPCR e ligar-se ao seu cofator não enzimático, a proteína S (PS). O complexo PC/PS inativa os fatores Va e VIIIa,

comprometendo a atividade dos complexos protrombinase e tenase (GRACHEN, 2010; MARTINICHEN, 2005).

2.1.3.4 Inibidor da Via do Fator Tissular

O inibidor da via do fator tissular (TFPI) é uma protease de massa molecular variando de 34 a 41 kDa, produzida pelas células endoteliais. O TFPI regula a ação do complexo formado pelos fatores VIIa e FT, que atua sobre os fatores IX e X (NOGUEIRA, 2013; FRANCO, 2001).

O TFPI apresenta três domínios do tipo Kunitz (K-1, K-2 e K-3). K-1 liga-se ao complexo fator VIIa/FT, enquanto K-2 liga-se ao fator Xa, inibindo-os e limitando a ativação dos fatores VII e X. Já o K-3 serve de sítio para ligação com a heparina, fazendo com que seu potencial inibitório seja aumentado (MINE *et al.*, 2002; FRANCO, 2001).

2.1.3.5 Fibrinólise

Tão importante quanto a formação de coágulo de fibrina é a remoção desse coágulo. A dissolução do coágulo de fibrina depende da sua retração e degradação da fibrina insolúvel (fibrinólise), processos que por sua vez dependem da interação de plaquetas e proteínas plasmáticas (CARLOS; FREITAS, 2007).

As enzimas do sistema fibrinolítico são do tipo serino proteases, ao passo que os inibidores fibrinolíticos são membros da superfamília das serpinas (inibidores de proteases séricas) (FRANCO, 2001).

A plasmina, uma serino protease produzida no fígado que circula no plasma na sua forma inativa, plasminogênio, é a responsável pela lise do coágulo de fibrina. O ativador de plasminogênio tecidual (*tissue type plasminogen activator* - tPA) e o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (*urokinase type plasminogen activator* - uPA) são os responsáveis por converter o plasminogênio circulante em plasmina (CARLOS; FREITAS, 2007; SMITH; DAY; MACKIN, 2005; FRANCO, 2001).

A fibrinólise é interrompida pela inibição da plasmina ou do tPA, pela α_2 -antiplasmina ou α_2 -macroglobulina e pelo inibidor do ativador do plasminogênio - I (*plasminogen activator inhibitor - I - PAI - I*) (GRACHER, 2010; SMITH; DAY; MACKIN, 2005;).

2.2 COAGULAÇÃO *IN VITRO*

O sangue coagula de 4 a 8 minutos quando colocado em tubo de ensaio. A coagulação é evitada com a adição de um agente quelante como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou citrato, que complexam com o cálcio do sangue, diminuindo a concentração plasmática de cálcio ionizado. O plasma recalcificado coagula de 2 a 4 minutos. Após a recalcificação o tempo de coagulação é reduzido para 26 a 33 segundos pela adição de fosfolipídios de carga negativa e de uma substância particulada como o caolim (silicato de alumínio). Esse processo pode ser verificado num teste denominado de tempo de tromboplastina parcial ativada (*activated partial thromboplastin time - aPTT*) (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006; GUYTON; HALL, 2006).

O aPTT é o teste comumente utilizado para verificar o mecanismo intrínseco de coagulação, mas também se pode verificar o mecanismo extrínseco com o teste de tempo de protrombina (*prothrombin time - PT*) e o processo de polimerização da fibrina pelo teste de tempo de trombina (*thrombin time - TT*) (FIGURA 4) (CURRY e PIERCE, 2007).

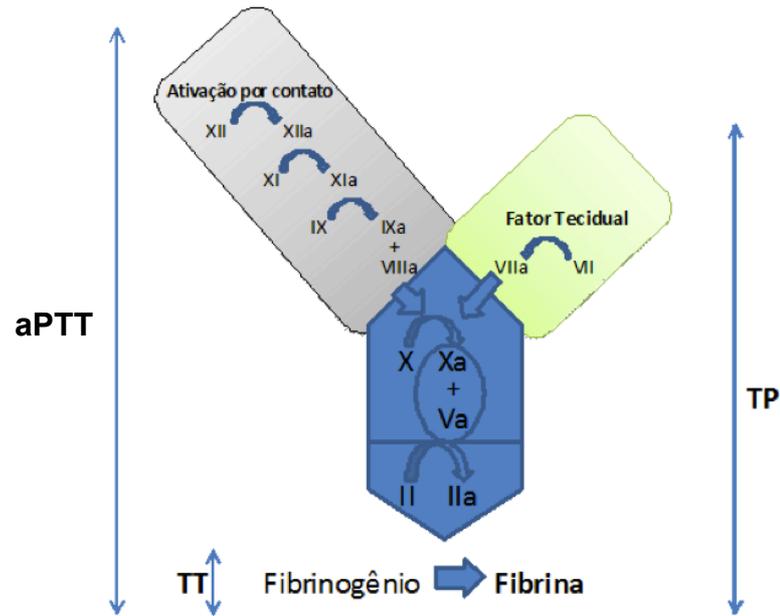


FIGURA 4 - VISÃO GERAL DOS TESTES DE COAGULAÇÃO
 FONTE: Adaptado de Clé *et al.* (2010)

2.3 DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS

Normalmente não ocorre ativação das plaquetas nem coagulação nos vasos sanguíneos intactos, mas caso haja um desequilíbrio no sistema hemostático o produto final dessa desordem é a trombose (MACKMAN, 2008). Por outro lado, esse desequilíbrio pode ser antagonista e gerar sangramentos excessivos resultantes da deficiência de qualquer um dos fatores de coagulação sanguínea.

Os sangramentos podem ser causados, dentre outros motivos, por deficiência de vitamina K ou de plaquetas (trombocitopenia). Já a trombose, doença de preocupação mundial, pode ser proveniente de um coágulo anormal que se desenvolva no vaso sanguíneo, sendo esse coágulo chamado de trombo. Esse trombo pode se soltar da parede do vaso e ser carregado pelo fluxo contínuo do sangue, passando a circular livremente, sendo então chamado de êmbolo. Os êmbolos originados no sistema arterial podem ocluir artérias ou arteríolas no cérebro, nos rins e outros locais. Já aqueles originados no sistema venoso, geralmente fluem para o pulmão, provocando a embolia pulmonar (GUYTON; HALL, 2006; EDELBERG, 2001).

2.3.1 Trombose Arterial

O fator desencadeante da trombose arterial é a ruptura de placas de aterosclerose, que se desenvolve pelo acúmulo de lipídeos na parede das artérias. Quando ocorre a ruptura de uma placa, o endotélio vascular é lesionado, recrutando as plaquetas, através da interação destas com o colágeno e com fator de von Willebrand, para o sítio da lesão (FIGURA 5A) (MACKMAN, 2008).

2.3.2 Tromboembolismo Venoso

No tromboembolismo venoso (TEV) o endotélio permanece intacto, mas pode ser convertido de uma superfície com propriedades anticoagulantes para uma com propriedades pró-coagulantes (FIGURA 5B) (MACKMAN, 2008). É uma patologia grave de alta incidência mundial, mas classificada como caso de morte evitável entre pacientes hospitalizados. Quando não diagnosticada precocemente e tratada adequadamente pode evoluir causando sérias complicações, como trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP) (VEIGA *et al.*, 2013; HEIT, 2008, COLMAN, 2006).

A TVP, também conhecida como flebite ou tromboflebite profunda, caracteriza-se pela formação de trombos em veias do sistema profundo. Ela geralmente acomete os membros inferiores, pois nestes o retorno do sangue é dificultado normalmente pela ação gravitacional. Se a circulação sanguínea se torna mais lenta, o sangue tende a estagnar-se, situação ideal para a formação de coágulos (MELO *et al.*, 2006; MELLO; DUQUE, 2003).

A EP é caracterizada pelo desprendimento do trombo das veias profundas e sua migração pela da corrente sanguínea até atingir a artéria pulmonar onde provoca obstrução da circulação e enfarte pulmonar (LOZANO, 2003; FRANCO, 2001).

Algumas das condições predisponentes para o TEV são:

- a) uso de anticoncepcionais ou tratamento hormonal;
- b) tabagismo;

- c) presença de varizes;
- d) obesidade;
- e) cirurgias de médio e grande portes;
- f) traumatismo;
- g) a fase final da gestação ou puerpério;
- h) idade avançada;
- i) câncer;
- j) fraturas ósseas;
- k) infecções.

A estase é também um importante fator predisponente, onde, após a formação inicial do trombo sua evolução se dá pela deposição de mais fibrina, de agregados plaquetários, de leucócitos e de hemácias (MELO *et al*, 2006; LOZANO, 2003).

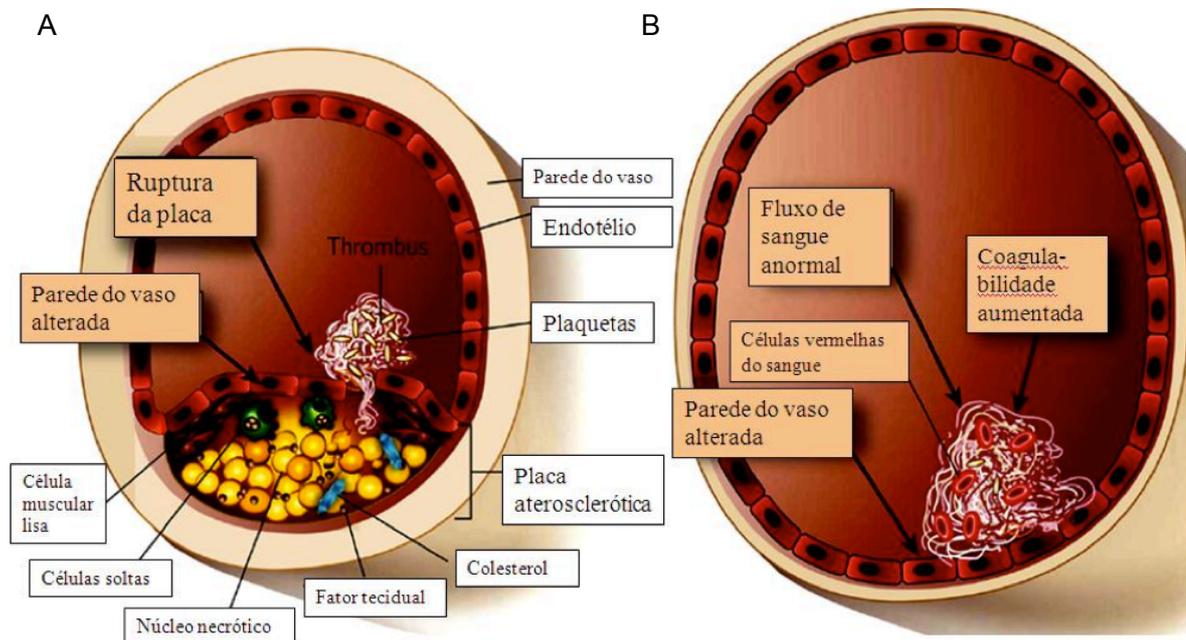


FIGURA 5 - TROMBOSE ARTERIAL E VENOSA
 NOTAS: A) Luz da artéria. B) Luz da veia
 FONTE: Adaptado de Mackman (2008)

2.4 AGENTES ANTICOAGULANTES E ANTITROMBÓTICOS

Os fármacos antitrombóticos disponíveis são eficientes na redução e prevenção da trombose arterial e venosa. Porém, o principal efeito colateral desses fármacos, a hemorragia, limita o uso desses medicamentos (MACKMAN, 2008; GRACHER, 2010).

A fisiopatologia da trombose arterial difere da trombose venosa, resultando em tratamentos distintos. De maneira geral, a trombose arterial é tratada com fármacos antiplaquetários, enquanto a trombose venosa é tratada com fármacos anticoagulantes. Exemplos de antiplaquetários são o ácido acetil salicílico e antiinflamatórios não-esteróides (JAY; LIU, 2006).

Os fármacos anticoagulantes reduzem a atividade de várias proteases na cascata de coagulação através de inibição direta, inibição de modificações pós-traducionais, ou pelo aumento da atividade de anticoagulante endógenos. Os anticoagulantes podem ser do tipo natural, oral ou parenteral. Dentre os parenterais, a heparina é o de maior destaque (MACKMAN, 2008; MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

2.4.1 Anticoagulantes Naturais

A trombose pode ser evitada através de vários mecanismos reguladores que exigem um endotélio vascular no estado normal, como por exemplo pela prostaciclina, que é um metabólito do ácido araquidônico sintetizado pelas células endoteliais capaz de inibir a agregação plaquetária quando necessário. A antitrombina, como comentado anteriormente, também tem a capacidade de interferir na trombose atuando sobre os fatores da cascata de coagulação. Os proteoglicanos de sulfato de heparan sintetizados pelas células endoteliais, são capazes de estimular a atividade da antitrombina (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

Além dos mecanismos já comentados aqui e anteriormente, como a inibição do fator Xa e do complexo fator VIIa/FT pelo TFPI, a proteína C ativada combinada com a proteína S, também é capaz de diminuir acentuadamente as taxas de

ativação da protrombina e do fator Xa, por meio da degradação dos fatores Va e VIIIa (NOGUEIRA, 2013; MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

2.4.2 Anticoagulantes Orais

Anticoagulantes orais são antagonistas da vitamina K e a principal toxicidade apresentada por eles é o sangramento. Clinicamente eles são utilizados para impedir a progressão ou a recidiva da TVP ou da EP (HIRSH *et al.*, 2003).

Os fatores de coagulação II, VII, IX, X e as proteínas C e S são sintetizados, em grande parte, no fígado. Ainda no interior celular, ocorre uma mudança pós-traducional, que consiste na γ -carboxilação de resíduos de glutamato destas proteínas. Esta reação é catalisada por uma enzima carboxilase dependente de vitamina K. A varfarina é um composto cumarínico que atua bloqueando a regeneração da vitamina K, reduzindo de 30 a 50% a ativação dos fatores de coagulação dependentes de vitamina K produzidos pelo fígado (GRACHER, 2010; MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

A varfarina é o anticoagulante oral mais popular, no entanto existem outros fármacos comercializados, como por exemplo, a femprocumona e acenocumarol, agentes não disponíveis nos EUA, mas prescritos em outros países, inclusive na Europa. Outros fármacos anticoagulantes orais incluem os derivados de indandiona (anisindiona e fenindiona), proibido em alguns países por acarretar hipersensibilidade grave no início da terapia. Rodenticidas como a bromodiolona, brodifacum, difenadiona, clorofacinona e pindona são agentes de longa duração que podem exigir altas doses de vitamina K durante semanas ou meses para reverter o quadro. Por fim, a ximelogatrana é um fármaco novo, com efeito colateral assintomático, mas ainda não aprovado para comercialização nos EUA (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2007).

2.4.3 Anticoagulantes Parenterais

Entre os agentes anticoagulantes parenterais, encontra-se os inibidores direto da trombina como a bivalirudina e a lepidurina, derivados da hirudina presente nas glândulas salivares das sanguessugas. A partir da hirudina outras substâncias foram desenvolvidas, entre elas, Hirulog, Hirugen e Argotroban (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006; JAY; LIU, 2006).

Também se encontram nesse grupo a argatrobana, que pode substituir a lepidurina, o danoparanóide, que promovem inibição do fator Xa, a adrotecogina, que inibe os fatores Va e Villa, e o principal deles, a heparina (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

2.4.3.1 Heparina

A heparina foi descoberta em 1916 por Jay McLean, um estudante do segundo ano de medicina, em colaboração com o Professor William Henry Howell, que foi o primeiro a utilizar o termo heparina, do Grego “Hepar” ou fígado, local de onde ela foi isolada. Como solução anticoagulante, a heparina foi testada pela primeira vez, em humanos, em 16 de abril de 1937, por Murray e Best (LIU; ZHANG; LINHARDT, 2009; WARDROP; KEELING, 2008). Porém não se sabia exatamente a que era atribuído o efeito anticoagulante. Somente mais tarde estudos demonstraram que essa atividade era dependente de um componente plasmático. Em 1968, Abildgaard confirmou estes dados após isolar, pela primeira vez, a antitrombina (VSKOV *et al.*, 2013; PETITOU; CASU; LINDAHL, 2003).

Sintetizada pelos grânulos secretores dos mastócitos, e obtida a partir do pulmão bovino ou da mucosa intestinal do porco, a heparina é um glicosaminoglicano altamente sulfatado, com massa molecular que pode variar de 3 e 30 kDa. Ela é composta majoritariamente pela repetição de uma unidade dissacarídica constituída por um ácido urônico, que pode ser ácido α -L-idurônico (IdoA) ou β -D-glucurônico (GlcA), e um aminoaçúcar, a α -D-glucosamina (GlcN) (FIGURA 6) (LIU; ZHANG; LINHARDT, 2009; ZHANG *et al.*, 2011).

A heparina é uma molécula bastante heterogênea. Exemplo disso é a possibilidade de presença ou de ausência de O-sulfato no carbono 2 (C-2) dos resíduos de ácido urônico, e no C-3 ou C-6 da glucosamina. Além do nitrogênio desse açúcar aminado poder apresentar-se na sua forma sulfatada (GlcNSO₃), acetilada (GlcNAc) ou, menos frequentemente, permanecer sem substituição (NOTI; SEEBERGER, 2005; CAPILA; LINHARDT, 2002).

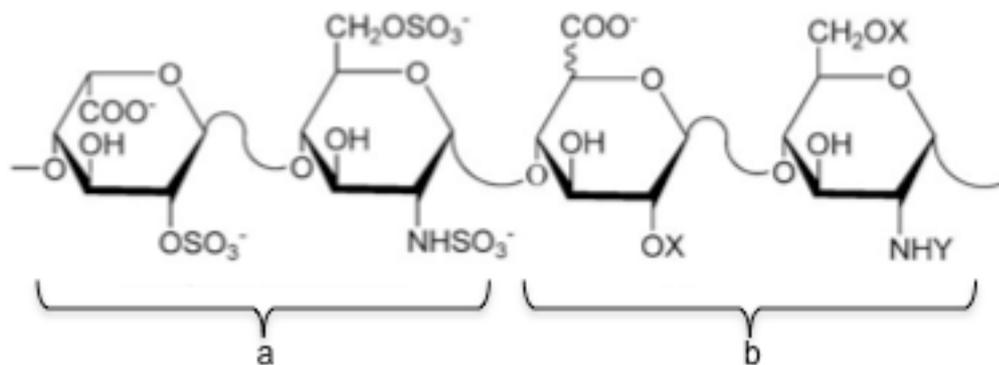


FIGURA 6 - ESTRUTURA DAS UNIDADES MAJORITÁRIAS E MINORITÁRIAS DA HEPARINA
 FONTE: Adaptado de Liu, Zhang e Linhardt (2009)
 NOTAS: A) Sequência majoritária de 2-O-sulfo- α -L-ácido idurônico-(1 \rightarrow 4)-6-O-sulfo-N-sulfo- α D-glucosamina. B) Sequência minoritária, onde X = SO₃⁻ ou VTh, e VTh = SO₃⁻ ou COCH₃

2.4.3.1.1 Mecanismo de Ação da Heparina

A heparina catalisa a inibição de várias proteases da coagulação de forma indireta, ou seja, ela atua potencializando a ação inibitória exercida pelas serpinas, como a antitrombina (AT) e cofactor II de heparina (HCII).

Essa ação catalítica da heparina é principalmente atribuída à habilidade de ligação a sítios básicos através de seus grupos sulfatos e carboxílicos carregados negativamente (CIPRIANI *et al.*, 2009).

Quando ligada, a heparina causa alteração na conformação da AT, fazendo com que seu local reativo se torne mais acessível, favorecendo a ligação da trombina ou do fator Xa. A heparina, serpina e serino protease ligadas, formam um complexo ternário capaz de aumentar a velocidade da reação de inibição da trombina pela AT em até 1.000 vezes. Logo em seguida a heparina é liberada

(MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

Apenas as heparinas com cadeias maiores que dezoito resíduos monossacarídicos, conhecidas como não-fractionadas (*unfractionated heparins* - UFH), conseguem fazer a ligação da AT com a trombina, isso porque elas apresentam uma sequência pentassacarídica específica, descrita em 1979 por Lindahl *et al.*, que contém um resíduo de glucosamina 3-O-sulfatada (FIGURA 7) (CLÉ *et al.*, 2010). As cadeias de heparina que não apresentam o resíduo de glucosamina 3-O-sulfatada normalmente tem menor afinidade com a antitrombina e acabam sendo responsáveis pela ligação ao cofator II da heparina (VISKOV *et al.*, 2013).

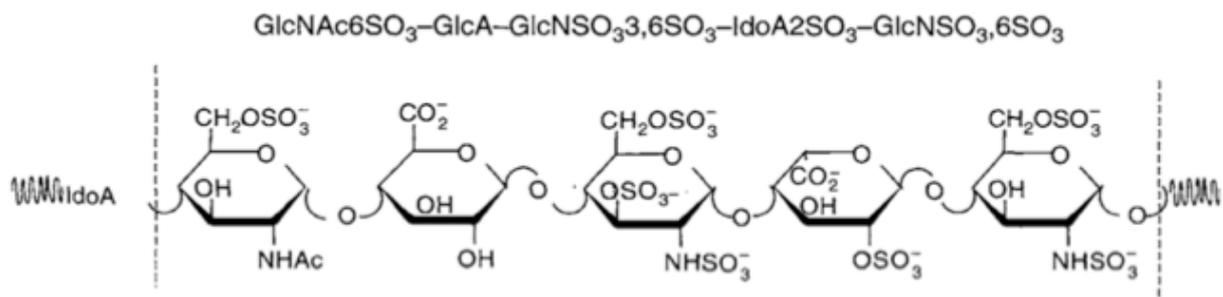


FIGURA 7 - SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DE LIGAÇÃO DA HEPARINA À ANTITROMBINA

FONTE; Adaptado de Casu (2005)

2.4.3.1.2 Limitações do Uso da Heparina

Atualmente a heparina é o principal agente anticoagulante e antitrombótico utilizado na prevenção e no tratamento de distúrbios tromboembólicos. Em relação à utilização só perde para a insulina no que diz respeito a agente terapêutico natural (HIRSH *et al.*, 2001), sendo que seu consumo anual já ultrapassou 100 toneladas (VISKOV *et al.*, 2013).

Apesar de seu efeito comprovado e sua popularidade, o uso da heparina como fármaco tem limitações e gera preocupação devido aos seus efeitos adversos, que podem implicar em sangramento, osteoporose, erupções na pele, dermatite de contato, urticarial, trombocitopenia induzida, falha hepática entre outros (MAAS *et*

al., 2012; MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006). Além disso, há a possibilidade de contaminação por prion e vírus já que ela é proveniente de fontes animais como a mucosa intestinal de porco ou pulmão bovino. Outro fator agravante é a diferença entre os lotes produzidos, uma vez que as moléculas de heparina são bastante heterogêneas estruturalmente (LIU; ZHANG; LINHARDT, 2009).

Desde os anos 90, após serem observados casos de encefalopatia espongiiforme bovina, ou doença da vaca louca ou doença do prion, somente a heparina derivada de porco pode ser utilizada nos EUA e Europa (NOGUEIRA, 2013; GRACHER, 2010).

O comportamento dose-resposta acentuado apresentado pela terapia com heparina também é uma limitação, pois um pequeno erro na dose pode levar a casos de hemorragia grave, derrame ou até a morte (NOGUEIRA, 2013).

2.4.3.2 Heparina de Baixa Massa Molecular

Na tentativa de melhorar o comportamento farmacológico da heparina e minimizar seus efeitos adversos, foram desenvolvidas as heparinas de baixa massa molecular (*low molecular weight heparins* – LMWH) a partir da clivagem enzimática ou química da heparina não-fracionada (UFH) (NOGUEIRA, 2013). Exemplos desse tipo de fármaco é a enoxaparina, dalteparina, tinzaparina, ardeparina, nadroparina e a reviparina (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

Assim como a UFH, a LMWH também apresenta a sequência pentassacarídica específica de ligação à AT, no entanto suas cadeias são menores (2 a 10 kDa) e por isso não tem extensão suficiente para formar o complexo ternário de UFH, AT e trombina. As alterações exercidas na AT pela LMWH são suficientes para catalisar apenas a inibição do fator Xa, como é o caso do pentassacarídeo sintético, fondaparinux (CLÉ *et al.*, 2010; MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

Mesmo apresentando menos efeitos adversos que as UFHs, as LMWHs ainda possuem algumas limitações. Também são polímeros heterogêneos, de massa molecular indefinida e cadeia polissacarídica variável (CAUGHEY, 2003). Além do fato delas não responderem bem ao sulfato de protamina, antagonista da heparina, utilizado no caso de uma superdosagem (GRACHER, 2010).

2.5 PROTAMINA

Um sangramento leve causado pelo tratamento com heparina pode ser controlado sem a administração de antagonista. Já numa hemorragia grave, o efeito anticoagulante da heparina é revertido com a infusão lenta de sulfato de protamina. A neutralização ocorre após 5 minutos da infusão.

A protamina é uma proteína extraída do esperma de diversas espécies de salmão, possui baixo peso molecular (5 kDa) e elevada proporção de arginina, um aminoácido básico, carregado positivamente em condições fisiológicas (AINLE *et al.*, 2009).

Clinicamente, a protamina é utilizada para reverter o efeito anticoagulante da heparina após cirurgia cardíaca e outros procedimentos vasculares. Ela deve ser administrada por via intravenosa (até 5 mg durante 10 minutos) em quantidade mínima suficiente para neutralizar a heparina existente no organismo (1 mg de protamina neutraliza 1000 U de heparina existente no paciente) (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006).

2.6 ESTUDOS ALTERNATIVOS À HEPARINA

Além do risco de hemorragias que um paciente tratado com heparina pode ter, existe a necessidade de monitoramento laboratorial contínuo durante o tratamento, o que o torna desvantajoso. Diante das limitações desse fármaco, diversos estudos vêm sendo realizados com polissacarídeos naturalmente ou quimicamente sulfatados, com o objetivo de descobrir novos agentes anticoagulantes e antitrombóticos, alternativos à heparina (MACKMAN, 2008; PERRINAUD *et al.*, 2006).

Polissacarídeos sulfatados são amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados como componentes de matriz extracelular, na superfície de células de vertebrados ou são sintetizados por organismos marinhos (ALBAN; SCHAUERTE; FRANZ, 2002).

Nagumo e Nishino (1996) estudaram fucanas naturalmente sulfatadas de

alga parda, e obtiveram dois grupos distintos delas. O primeiro grupo de fucanas apresentou altas porcentagens de ácido glucurônico, mas baixo grau de sulfatação. A maioria dos grupos sulfatos ocupava a posição C-3 das unidades de fucose (1→4) ligadas. Este grupo apresentou atividade anticoagulante muito baixa, assim como para outras fucanas sulfatadas com características químicas similares. O segundo grupo de fucanas apresentava baixa porcentagem de ácido glucurônico, mas alto grau de sulfatação nas unidades de fucose. No entanto, foi verificado o mesmo resultado que no grupo anterior, ou seja, baixa atividade anticoagulante, demonstrando que o teor de grupos sulfatos é apenas um dos fatores requeridos para esta atividade. Esta observação também foi feita nos estudos de Chevolut *et al.* (1999) e Mulloy, Mourão e Gray (2000), onde considerações sobre a posição do grupo sulfato e sua relevância para a atividade anticoagulante foram ditas como importantes, visto que as funções biológicas dependem da ligação específica da estrutura do carboidrato com seu alvo.

Mourão e Pereira (1999) realizaram estudos com polissacarídeos de algas pardas e equinodermos e verificaram atividade anticoagulante e antitrombótica para ambos. No entanto, após um processo de dessulfatação a propriedade anticoagulante *in vitro* deixou de existir, mostrando a importância e a necessidade de grupos sulfato para o efeito sobre a coagulação. Eles também apresentaram avaliações relacionadas com o mecanismo de ação sobre a inibição da α -trombina e puderam verificar que, na presença de antitrombina ou cofator II de heparina, o polissacarídeo sulfatado era eficiente, mas trocando um monossacarídeo, a posição de entrada do grupo sulfato ou até mesmo a posição da ligação glicosídica, esse efeito não era considerável.

Em 2014, Yufeng *et al.* estudaram um polissacarídeo de *Umbilicaria esculenta*, um líquen utilizado na culinária chinesa. Eles verificaram que, *in vivo* e *in vitro*, esse polissacarídeo era um agente promissor no tratamento de doenças trombóticas.

Assim como os polissacarídeos naturalmente sulfatados, polissacarídeos susceptíveis a sulfatação também são amplamente distribuídos na natureza. Pensando nisso, muitos pesquisadores começaram a extrair polissacarídeos de líquens, invertebrados, frutos ou gomas, com intenção de sulfatá-los e verificar sua atividade biológica.

Liu *et al.* (2009) e Jiang *et al.* (2015) sulfataram quimicamente os polissacarídeos provenientes de fungos e bivalves, respectivamente, a fim de verificar alguma atividade biológica. A inserção do grupo sulfato na posição C-6 da glucose por Jiang resultou numa melhor atividade antitumoral *in vitro* em comparação com a mesma amostra não sulfatada. Já a sulfatação em C-2, realizada por Liu em 2009, na qual não foi observado degradação do polissacarídeo durante o processo de modificação química, tornou o polissacarídeo potencialmente antiangiogênico.

Trabalhando com glucanas de fungos, Vasconcelos (2009), verificou que o processo de sulfatação química aumentava a solubilidade do polissacarídeo além de induzir uma atividade anticoagulante acentuada em relação à molécula não sulfatada.

Martinichen-Herrero *et al.* (2005) sulfatou quimicamente uma glucana obtida de líquen, sendo os grupos sulfatos inseridos, principalmente, nas posições C-2 e C-3 da glucana. Testado como anticoagulante e antitrombótico, o polissacarídeo quimicamente sulfatado se mostrou promissor.

Com a proposta de avaliar esses mesmos efeitos biológicos, Liang *et al.* (2014), Dore *et al.* (2013) e Wang (2013) sulfataram quimicamente polissacarídeos de diferentes algas e verificaram atividade anticoagulante. No entanto, eles apresentaram pontos de vista diferentes em relação ao motivo dessa atividade se elevar. Liang atribui essa atividade exclusivamente à posição de entrada do grupo sulfato, enquanto Dore, à presença do grupo sulfato, já Wang afirma existir uma relação entre o grau de sulfatação e a posição C-3 substituída por grupamentos sulfato para que haja uma atividade anticoagulante representativa.

Araújo *et al.* (2013) sulfataram regioseletivamente uma carragenana naturalmente sulfatada e verificaram uma melhor atividade anticoagulante *in vitro* quando a posição de entrada do grupo sulfato ocorria no C-2 e C-6 das unidades de galactoses. A densidade de grupos sulfato inseridos também foi importante para a atividade.

Após sulfatar quimicamente polissacarídeos de cogumelos, Gracher *et al.* (2010) concluíram que a atividade anticoagulante e antitrombótica observada foi dependente da estrutura, do teor de sulfato, da ocorrência de oligossacarídeos específicos e da massa molecular dos polissacarídeos. Este último fator foi alvo da investigação de Cipriani *et al.* (2009) que utilizaram polissacarídeos quimicamente

sulfatado derivados de pectina cítrica com diferentes massas moleculares (Pec-LWS: 3,600 g/mol e Pec-HWS: 12,600 g/mol). Eles verificaram que ambos os polissacarídeos quimicamente sulfatados apresentavam atividade anticoagulante *in vitro*, mas *in vivo* a Pec-HWS apresentou maior potencial antitrombótico e menor risco de hemorragia comparado com a heparina, constatando a importância do peso molecular na atividade biológica acima mencionada.

Cipriani *et al.* (2009) chamaram a atenção para o mecanismo de ação do polissacarídeo sulfatado mostrando que, ao contrário da heparina, Pec-HWS e Pec-LWS eram capazes de inibir a α -trombina e o factor Xa por um mecanismo independente de antitrombina ou cofactor de heparina II.

Polissacarídeos extraídos de goma de bael, do caqui e da laranja, quando submetidos ao processo de sulfatação química por Jindal *et al.* (2013), Lu *et al.* (2012), Maas *et al.* (2012), respectivamente, demonstraram potencial biológico, incluindo atividade anticoagulante e antitrombótica. Maas *et al.* (2012) verificaram baixo risco de sangramento e um mecanismo de ação anticoagulante similar ao da heparina, ou seja, dependente de serpina. Além de constatar que na ausência dos grupos sulfato, os polissacarídeos não afetavam o teste de aPTT. Jindal *et al.* (2013) observaram que a razão entre o polissacarídeo, a piridina usada no processo de sulfatação e a temperatura de reação têm um papel importante na quantidade final de grupos sulfato inseridos na molécula. Lu *et al.* (2012) verificaram que além de depender das condições de sulfatação, a atividade anticoagulante observada em seu trabalho, também foi dependente do grau de sulfatação e do peso molecular do polissacarídeo.

Ambos os efeitos, anticoagulante e antitrombótico, estão relacionados à presença de grupos sulfato, suas posições e distribuição ao longo da cadeia do polissacarídeo. Além disso, estas propriedades são influenciadas pelo tipo e estereoquímica dos monossacarídeo que constituem o polissacarídeo, e pelo tipo de ligação glicosídica que os une (POMIN, 2009).

2.7 *Vochysia thyrsoidea*

V. thyrsoidea é uma árvore da família Vochysiaceae, muito comum nos cerrados e campos de altitude (acima de 800 m), atingindo de 4 a 11 m de altura e 20 a 40 cm de diâmetro, dotada de copa irregular, tronco tortuoso e casca grossa fissurada longitudinalmente (FIGURA 8). Sua madeira tem média resistência mecânica e é pouco durável, por isso é usada para construções rústicas, lenha e carvão. A seiva fermentada fornece um líquido vinoso. Popularmente é conhecida como pau doce, vinheiro, pau de vinho, pau d'água, gomeira, goma arábica de lagoa santa, vinheiro do campo, pau de goma. Sua floração acontece nos meses de novembro e dezembro e os frutos amadurecem em agosto e setembro. A exsudação característica do tronco dessa árvore se assemelha à goma arábica, sendo, no entanto, uma substância adesiva muito mais aglutinante (LORENZI, 2002).

Segundo Sandford e Baird (1983) o termo goma, de um modo geral, é usado para definir os produtos de natureza polissacarídica que são exsudatos vegetais, geralmente resultantes de traumatismos. Estas gomas se acumulam em lacunas situadas em diferentes tecidos da árvore e, quando ela passa por condições de estresse, como injúria física, ataque de microorganismos, períodos de estiagem e outros fatores ambientais, há um favorecimento na exsudação. Essas gomas são constituídas principalmente por polissacarídeos e são facilmente vistos nos troncos, galhos ou frutos como massas de cor variável e às vezes secas (WAGNER, 2007).

O polissacarídeo extraído da goma da *V. thyrsoidea* foi caracterizado como uma glicoglucuronomanana com massa molar média de 92.500 g/mol, constituída por Ara:Xyl:Man:Gal:Glc:GlcA, na proporção molar de 28:4:29:10:5:24, tendo sua cadeia principal formada por unidades dissacarídicas repetitivas de $\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow (WAGNER *et al.*, 2008).



FIGURA 8 - *Vochysia thyrsoidea*
FONTE: IBRAM – Instituto Brasília Ambiental (2015)

3 JUSTIFICATIVA

A heparina é muito empregada no controle de distúrbios relacionados à hipercoagulação sanguínea, no entanto, inúmeros efeitos adversos já foram relatados. A busca por moléculas que possam ser uma alternativa ao uso da heparina, que sejam potencialmente seguras e de fácil e ampla obtenção, tem gerado grande interesse na área científica. O foco são as moléculas obtidas de origem não animal, já que a heparina é proveniente da mucosa intestinal de porco ou pulmão bovino, podendo apresentar contaminação por patógenos. Uma alternativa é o estudo de polissacarídeos de origem vegetal. Os resultados obtidos com esses polissacarídeos têm sido promissores, contudo, uma vez que grupamentos sulfato não ocorrem naturalmente em polissacarídeos de plantas, mas são uma característica essencial para os efeitos anticoagulante e antitrombóticos da heparina, uma estratégia para a obtenção de novos agentes com atividade anticoagulante e antitrombótica é a sulfatação química destes polissacarídeos.

4 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo obter polissacarídeos com atividade anticoagulante e antitrombótica a partir da goma de exsudato de *V. thyrsoidea*.

Os objetivos específicos foram:

- a) Modificar estruturalmente o polissacarídeo da goma de *V. thyrsoidea* por meio de hidrólise ácida parcial e sulfatação química;
- b) Caracterizar estruturalmente esse polissacarídeo por técnicas de RMN e metilação;
- c) Avaliar a atividade anticoagulante *in vitro*, por aPTT, do polissacarídeo nativo quimicamente sulfatado e do polissacarídeo obtido após a hidrólise ácida parcial, também quimicamente sulfatado;
- d) Avaliar o efeito anticoagulante *ex vivo*, por aPTT, dos polissacarídeos quando administrados por via subcutânea em ratos;
- e) Avaliar a atividade antitrombótica *in vivo* desses polissacarídeos;
- f) Determinar o provável mecanismo anticoagulante e antitrombótico destes polissacarídeos pela avaliação dos seus efeitos inibitórios *in vitro* sobre as enzimas α -trombina e fator Xa da cascata de coagulação.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

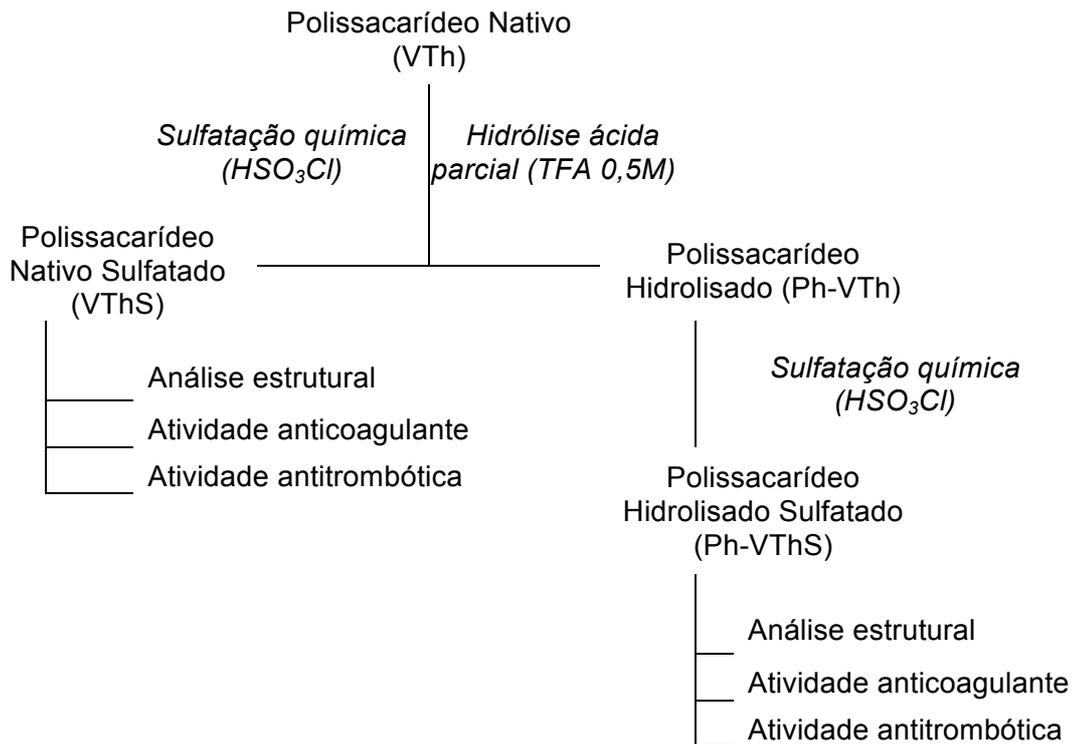


FIGURA 9 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

FONTE: O autor (2015)

NOTA: Após o processo de sulfatação química as amostras foram dialisadas em membrana de exclusão de 12-14 kDa

5.2 MATERIAL DE ESTUDO

O polissacarídeo escolhido para desenvolver esse estudo foi uma glicoglucuronomanana obtida da goma de exsudato de *Vochysia thyrsoidea*. Ele foi gentilmente cedido pela Dra. Fernanda F. Simas Tosin, do Laboratório de Química de Carboidratos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Paraná. Wagner *et al.* (2008) realizaram a extração e caracterização estrutural desse polissacarídeo nas suas formas nativa e hidrolisada

parcialmente, e definiram que a sua cadeia principal é constituída pela repetição da unidade dissacarídica $\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glc}p\text{A-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Man}p\text{(1}\rightarrow$.

5.3 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO

5.3.1 Hidrólise Ácida Parcial

A hidrólise ácida parcial do polissacarídeo foi realizada para a obtenção da sua cadeia principal. O polissacarídeo nativo (VTh, 4 g) foi parcialmente hidrolisado com TFA 0,5 M (600 mL), a 100 °C por 4h, em sistema de refluxo. O volume foi reduzido, em evaporador rotativo, até 200 mL e a solução tratada com etanol (4 volumes) para precipitação do polissacarídeo resistente à hidrólise ácida parcial. Em seguida o material foi filtrado, o precipitado ressolubilizado em água destilada, a solução neutralizada com NaOH e dialisada em membrana com limite de exclusão de 6-8 kDa, em sistema fechado por 2 dias. Em seguida, o material foi concentrado em evaporador rotativo e liofilizado, sendo essa amostra denominada Ph-VTh.

5.3.2 Sulfatação Química

Os polissacarídeos, nativo (VTh) e hidrolisado (Ph-VTh), foram sulfatados por uma adaptação do método de O'Neill (1955). Cada polissacarídeo (400 mg) foi solubilizado em 40 mL de formamida e, em seguida, à esta solução foram adicionados 40 mL de piridina. A mistura foi então colocada em banho de gelo para a adição de ácido clorossulfônico, gota a gota e sob agitação, na proporção de 10 mols de ácido para cada mol de hidroxila livre do polissacarídeo. A reação foi interrompida pela adição de gelo, seguida por neutralização com solução de NaHCO_3 a 10% (p/v). O material foi dialisado contra água destilada em sistema fechado por 2 dias, usando uma membrana com limite de exclusão de 12-14 kDa e, então, foi concentrado em evaporador rotativo e liofilizado, obtendo-se o

polissacarídeo nativo sulfatado (VThS) e o polissacarídeo hidrolisado sulfatado (Ph-VThS).

5.4 ANÁLISE ESTRUTURAL

5.4.1 Composição Monossacarídica

As composições monossacarídicas de VThS e Ph-VThS foram determinadas após a hidrólise de 2 mg dos polissacarídeos com 1 mL de TFA 2 M, a 100 °C em estufa, por 8h. As soluções foram evaporadas até a secura e o resíduo dissolvido em 1 mL de H₂O com posterior adição de amônia (até pH 14), para evitar a formação de glucuronolactona, e reduzido com 2 mg de NaBH₄. Após 18h, ácido acético foi adicionado, as soluções evaporadas até secura e, posteriormente, lavadas por repetidas evaporações com metanol (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). Os alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1 v/v; 0,5 mL), a temperatura ambiente, *overnight*. As reações foram interrompidas com gelo e os acetatos de alditóis extraídos com clorofórmio, os quais foram lavados diversas vezes com solução aquosa de CuSO₄ a 5% para a eliminação da piridina residual. A fase clorofórmica foi, então, desidratada com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada à temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Os acetatos de alditóis foram analisados por GC-MS e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons.

5.4.2 Análise de Homogeneidade

A homogeneidade dos polissacarídeos (VTh, Ph-VTh, VThS, Ph-VThS) foi determinada por cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência (HPSEC). As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido equipado com quatro colunas de

gel permeação, com limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ dispostas em série, e com detectores de índice de refração e de espalhamento de luz laser de multiângulos. O eluente foi uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) 0,1 M contendo 200 ppm de azida de sódio (NaN_3), com um fluxo de 0,6 mL/min. As amostras foram solubilizadas na mesma solução utilizada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/mL. Posteriormente, foram filtradas em membrana de acetato de celulose com poros de 0,22 μm . O volume de injeção foi de 100 μL .

5.4.3 Determinação da Massa Molar

Para determinar a massa molar dos polissacarídeos, a taxa de variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc) foi calculada para cada amostra. Os polissacarídeos foram solubilizados na solução usada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/mL, e filtradas através de membrana de acetato de celulose com diâmetro médio dos poros de 0,22 μm . As amostras foram diluídas para as concentrações de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL e analisadas por HPSEC utilizando-se apenas o detector de índice de refração, com as colunas desacopladas. O fluxo do solvente foi de 0,1 mL/min, uma quantidade de 500 μL de amostra foi injetada no equipamento e os resultados foram analisados pelo software ASTRA 4.70.07.

5.4.4 Dosagem de Ácidos Urônicos

A quantidade de ácidos urônicos dos polissacarídeos VThS e Ph-VThS foi determinada segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Foram misturados 0,4 mL de uma solução contendo uma quantidade conhecida de polissacarídeo, 40 μL de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6) e 2,4 mL de tetraborato de sódio (75 mM em H_2SO_4). A mistura foi incubada em banho-maria fervente por 20 min e após o resfriamento dos tubos foram adicionados 80 μL de m-

hidroxibifenila (0,15% p/v em NaOH 0,5% p/v). A presença de ácidos urônicos foi visualizada pelo aparecimento de coloração rósea lida em 525 nm (sensibilidade do método = 0,97 - 38,8 µg de ácido glucurônico).

5.4.5 Carboxirredução

O processo de carboxirredução dos ácidos urônicos dos polissacarídeos (VThS e Ph-VThS) foi realizado segundo Taylor e Conrad (1972). Cada polissacarídeo (20 mg) foi solubilizado em 2 mL de tampão MES [ácido 2-(*N*-morfolina)-etanosulfônico] (0,2 M, pH 4,75) e 24 mg de carbodiimida [ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida] foram adicionados para cada mg de ácido urônico contido na amostra. Após 2h de agitação, tampão TRIS (2 M, pH 7,0) foi adicionado até a mistura atingir pH 7,0. Como agente redutor foi empregado NaBH₄ (concentração final de 2 M). Durante a adição do NaBH₄ o pH da solução foi monitorado e ajustado para 7,0, quando necessário, com HCl diluído. Após 12h, a redução foi interrompida pela adição de ácido acético até pH 5,0. O material foi dialisado em membranas com limite de exclusão de 3,5 kDa, concentrado e liofilizado. Após 2 ciclos de carboxirredução foram obtidas as frações VThSCR₂ e Ph-VThSCR₂.

5.4.6 Análise de Metilação

Uma vez que polissacarídeos sulfatados normalmente são insolúveis em dimetilsulfóxido (DMSO), o processo de metilação dos polissacarídeos quimicamente sulfatados foi conduzido com os polissacarídeos na forma de sal de piridíneo. Este sal foi formado pela solubilização de 10 mg dos polissacarídeos sulfatados (VThS e VThS) em 10 mL água destilada com posterior adição de resina catiônica na forma H⁺, sob agitação magnética a temperatura ambiente, por 30 minutos. O pH do sobrenadante foi mantido entre 1,0 e 2,0. Os polissacarídeos sulfatados com os grupamentos sulfato protonados foram separados da resina por

filtração. O material foi, então, neutralizado com piridina até pH 7,0 e liofilizado, obtendo-se o polissacarídeo sulfatado na forma de sal de pirídíneo (NAGASAWA; INOUE; TOKUYASU, 1979).

Os polissacarídeos sulfatados em forma de sal (VThS e Ph-VThS), não sulfatado (VTh) e carboxirreduzidos (VThSCR₂ e Ph-VThSCR₂) foram metilados de acordo com o método de Ciucanu e Kerek (1984). Cada polissacarídeo (2 mg) foi solubilizado em 0,5 mL DMSO. Após, foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) desidratado e triturado (150 mg) e 0,5 mL de iodeto de metila (CH₃I). A solução foi mantida sob agitação em vórtex por 30 minutos e posterior repouso por 24 horas. Então o material foi neutralizado com ácido acético, pH 5,0 - 7,0, em banho de gelo e dialisado em membrana de 6-8 kDa de limite de exclusão e posteriormente liofilizado. Os polissacarídeos metilados foram hidrolisados com H₂SO₄ 5,5% v/v, por 16h a 100 °C. Após a hidrólise o material foi neutralizado com BaCO₃ até pH 7,0, filtrado, reduzido com NaBD₄ e acetilado com uma mistura de anidrido acético:piridina (1:1, v/v; 0,5 mL) a temperatura ambiente, *overnight*. A reação foi interrompida com gelo, os acetatos de alditóis parcialmente O-metilados foram extraídos com clorofórmio e analisados por GC-MS e os acetatos de alditóis parcialmente O-metilados foram identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons (SASSAKI *et al.*, 2005).

5.4.7 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas foram realizadas em cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3.300 acoplado a um espectrômetro de massas de marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-225. As injeções nas colunas foram feitas partindo-se de 50 °C (temperatura mantida por 1 min), seguindo-se um aumento gradual da temperatura em uma razão de 40 °C/min até 215 °C (acetatos de alditóis parcialmente O-metilados) ou 220 °C (acetatos de alditóis), sendo mantida isotermicamente até o final da análise. Hélio ultra puro foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 mL/min.

5.4.8 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Espectros de RMN do tipo HSQC-editado ¹³⁵ foram obtidos em espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE-DRX-400, incorporados a transformador de Fourier, com *probe* de 5 mm de diâmetro, do Centro de RMN do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da UFPR.

Os polissacarídeos, VTh, Ph-VTh, VThS e Ph-VThS (3 mg), foram solubilizados em 600 µL de óxido de deutério (D₂O) e analisados a 30 °C. Acetona foi utilizada como referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em p.p.m.

5.4.9 Determinação do Grau de Substituição por Grupos Sulfato (DS)

A dosagem de sulfato em VThS e Ph-VThS foi realizada do método turbidimétrico descrito por Dodgson e Price (1962). Em 40 mL de água destilada aquecida (60 – 70 °C) foram solubilizados 200 mg de gelatina (5 mg/mL). A solução foi mantida em refrigerador por 12h. Em seguida foram adicionados 200 mg de cloreto de bário sob agitação lenta e novamente manteve-se a solução sob refrigeração por mais 2h. As frações polissacarídicas, VThS e Ph-VThS (4 mg) foram submetidas a hidrólise, utilizando 1 mL de HCl 1 N, a 105 °C - 110 °C por 5h. Cada fração hidrolisada (0,2 mL) foi tratada com 3,8 mL de ácido tricloroacético 3% (p/v) e com 1,0 mL de solução de cloreto de bário-gelatina. Após 15 minutos em temperatura ambiente, foi determinada a absorvância em espectrofotômetro (360 nm) para cada amostra (triplicata). O teor de sulfato foi determinado em relação a uma curva padrão de sulfato de sódio (20 a 180 µg/mL). Em seguida, o grau de substituição dos polissacarídeos por grupos sulfato foi calculado utilizando a seguinte fórmula (WHISTLER; SPENCER, 1964):

$$DS = \frac{155,53 \text{ ou } 168,5 \times S}{3200 - (102 \times S)}$$

Onde:

155,53 = massa molar média das unidades monossacarídicas de VThS

168,5 = massa molar média das unidades monossacarídicas de Ph-VThS

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

102 = representa 1 mol do éster substituinte (SO₃Na)

S = representa o teor de enxofre dado em porcentagem

5.5 ANÁLISES *IN VITRO*

5.5.1 Determinação da Potência Anticoagulante dos Polissacarídeos

A atividade anticoagulante dos polissacarídeos quimicamente sulfatados ou não, foi determinada *in vitro* por aPTT (*activated partial thromboplastin time*), por comparação com a atividade de um padrão de heparina não-fracionada. Uma curva de calibração (log de aPTT x UI de heparina) foi obtida utilizando concentrações variadas de um padrão internacional de heparina suína não-fracionada com 200,47 UI/mg de atividade (6th *International Standard 2009*).

Para a análise foi utilizado o coagulômetro COAG-A-MATE® XM (Organon Teknika Corporation, Durhan, NC) e o kit HemosiL® (Instrumentation Laboratory) para aPTT. Plasma ovino citratado (100 µL) (lote: 044/11 DFI – UFSM) foi incubado a 37 °C com solução salina ou polissacarídeo por 1 minuto (q.s.p. 100 µL). Em seguida, cefalina de coelho foi adicionada (100 µL). Após 2,5 minutos, CaCl₂ a 25 mM (100 µL) foi adicionado e o tempo de coagulação determinado. Cada amostra foi analisada em duplicata.

5.5.2 Ensaio de Inibição da Atividade Anticoagulante dos Polissacarídeos com Protamina

Para a análise foi utilizado o coagulômetro COAG-A-MATE® XM (Organon Teknika Corporation, Durhan, NC) e o kit HemosiL® (Instrumentation Laboratory) para aPTT. Plasma ovino (100 µL) (lote: 044/11 DFI – UFSM) foi incubado a 37 °C por 1 minuto com solução salina ou 0,15 UI de polissacarídeo (VThS, Ph-VThS, ou heparina não-fracionada) acrescidos de protamina (1 e 2 µg) (amostra + protamina = 100 µL). Em seguida, cefalina de coelho foi adicionada (100 µL). Após 2,5 minutos, CaCl₂ a 25 mM (100 µL) foi adicionado e o tempo de coagulação determinado. Cada amostra foi analisada em quadruplicata.

5.5.3 Ensaio de Inibição de α-Trombina ou Fator Xa

O ensaio foi realizado em placa com 96 poços. A concentração final para a reação foi de 100 nM de antitrombina (AT) ou 15 nM de cofator II de heparina (HCII), 6 nM de α-trombina ou 8 nM de fator Xa, adquiridos da empresa Haematologic Technologies Inc. (Essex Junction, VT, USA), e 1 a 1×10^{-3} UI/mL de polissacarídeo quimicamente sulfatado (VThS ou Ph-VThS), em tampão TS/PEG pH 7,4 (Tris/HCl 0,15 M, NaCl 0,15 M e polietilenoglicol 8000 1 mg/mL, pH 7,4 ajustado com HCl). A α-trombina ou fator Xa foram adicionados para iniciar a reação. Após 1 minuto de incubação a 37 °C foram adicionados 100 µM dos substratos cromogênicos específicos (Chromogenix AB - Molndal, Suécia) S-2238 para α-trombina e S-2222 para fator Xa, sendo o volume final da reação de 100 µL. O volume de cada componente adicionado à reação foi de 25 µL. As atividades residuais da α-trombina e do fator Xa foram determinadas pela leitura das absorbâncias em 405 nm, por 15 min. A absorbância obtida na ausência dos polissacarídeos foi considerada como 100% de atividade da α-trombina ou fator Xa. Cada amostra foi analisada em triplicata. O ensaio também foi realizado na ausência de AT e HCII.

5.6 ANÁLISES *IN VIVO*

5.6.1 Animais

Os experimentos *in vivo* foram realizados com ratos Wistar machos pesando de 180 a 220 g, obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Todos os protocolos experimentais com os animais foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (autorização 767), e foram realizados de acordo com *Principles of Laboratory Animal Care* (NIH publicação 85 - 23, revisada em 1985), adotado pela Universidade Federal do Paraná.

5.6.2 Análise da Atividade Antitrombótica: Modelo de Trombose Venosa Estase-Induzida em Ratos

A formação do trombo foi induzida por uma combinação de estase e hipercoagulabilidade (VOGEL *et al.*, 1989; BERRY *et al.*, 1994). Os ratos foram anestesiados com uma injeção intramuscular de uma mistura de cetamina (100 mg/kg de peso corpóreo) e xilasina (16 mg/kg de peso corpóreo) e colocados em posição supina sobre a mesa cirúrgica. A artéria carótida direita foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada para administração de PBS (*phosphate buffered saline*: 39,74 g de NaCl, 10 g de KCl, 5,75 g de Na₂HPO₄, 1 g de KH₂PO₄ em 1 L de água destilada, com pH ajustado para 7,2 com HCl 1 M), polissacarídeos e tromboplastina. A veia cava abdominal foi cuidadosamente dissecada e suturas frouxas foram colocadas na veia cava logo abaixo da veia renal direita e logo acima das veias femorais, e na veia renal esquerda. Veículo (PBS), polissacarídeos quimicamente sulfatados (VThS ou Ph-VThS) ou heparina (10, 20 e 40 UI/kg), foram injetados pela artéria carótida direita e, após uma circulação de 5 min, a formação do trombo foi induzida pela infusão de tromboplastina (5 mg/kg de peso corpóreo) e,

após 20 segundos, pela estase de um segmento de 0,7 cm da veia cava abdominal (segmento localizado entre as suturas). Após 20 min, o trombo formado no interior do segmento ocluído foi cuidadosamente removido, lavado com PBS, liofilizado e pesado. Para cada grupo de animais testados ($n = 6$), a média do peso do trombo \pm erro-padrão da média (EPM) foi determinada e expressa como uma porcentagem do peso, com 100% representando a ausência de qualquer inibição de trombose (peso do trombo com a administração de PBS).

5.6.3 aPTT *Ex Vivo*

Foram injetados em ratos, subcutaneamente na região dorsal, 0,2 mL de veículo (PBS), heparina de baixa massa molecular comercial (clexane; 300 UI/kg), ou polissacarídeo quimicamente sulfatado (500 UI/kg de VThS ou Ph-VThS). Após 1,5h, os ratos foram anestesiados com uma injeção intramuscular de uma mistura de cetamina (100 mg/kg de peso corpóreo) e xilasina (16 mg/kg de peso corpóreo) e colocados em posição supina sobre a mesa cirúrgica. A artéria carótida direita foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada para coletar 0,5 mL de sangue em tubo com 50 μ L de citrato de sódio 3,8%. O sangue foi colhido na segunda e terceira horas após a injeção do veículo ou da amostra. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 10 min e o plasma foi usado no ensaio de aPTT. O plasma (50 μ L) foi incubado a 37 °C por 1 min. Posteriormente foi adicionado cefalina de coelho (50 μ L) e, após 2,5 min, CaCl_2 25 mM (50 μ L) e, então, o tempo de coagulação determinado. Os resultados foram expressos como aPTT \pm erro médio padrão (EPM) ($n = 3$).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA e sequencialmente pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE ESTRUTURAL DO POLISSACARÍDEO NATIVO E HIDROLISADO PARCIALMENTE

6.1.1 Análise da Homogeneidade, Cálculo da Massa Molar (M_w) e Composição Monossacarídica

A análise estrutural ou caracterização química de polissacarídeos é um processo trabalhoso, pois a estrutura dos açúcares de ocorrência natural é muito diversificada e por isso é difícil definir um protocolo único para análise, principalmente para polímeros complexos. Portanto, a estrutura química é determinada a partir de um conjunto de técnicas (VASCONCELOS, 2009).

A caracterização química dos polissacarídeos é precedida pela comprovação da homogeneidade das moléculas, portanto a primeira análise realizada nesse estudo, foi a análise de homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC). O polissacarídeo nativo (VTh) apresentou um perfil de eluição homogêneo em HPSEC, indicando a presença de apenas um tipo de polissacarídeo (FIGURA 10). O mesmo perfil e tempo de eluição foram observados por Wagner *et al.* (2008) quando analisaram esse mesmo polímero, o qual, segundo eles, apresentou massa molar (M_w) de 92.500 g/mol ($dn/dc = 0,212$), com pequeno grau de polidispersão, indicado pela largura do pico obtido.

Wagner *et al.* (2008) descreveram a composição monossacarídica para VTh e mostraram que a hidrólise ácida parcial desse polissacarídeo produz uma cadeia principal composta majoritariamente por ácido glucurônico e manose (Ph-VTh) (TABELA 2). As unidades de Glc observadas na análise de composição monossacarídica são derivadas de glucuronolactona originada a partir de unidades de GlcA, durante o processo de hidrólise ácida dos polissacarídeos (WAGNER *et al.*, 2008). Portanto, glucose não está presente como um monossacarídeo constituinte da glicoglucuronomanana da goma de exsudato de *V. thyrsoidea*.

Com a intenção de se obter um polissacarídeo constituído por unidades de monossacarídeos ácidos e neutros alternadas, uma característica observada na heparina, foi empregado sobre VTh o mesmo protocolo de hidrólise ácida parcial utilizado por Wagner *et al.* (2008). Além disso a redução da massa molecular do polissacarídeo, provocada pela hidrólise ácida parcial, poderá fornecer uma molécula com possibilidade de administração subcutânea.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NATIVA E HIDROLISADA OBTIDAS DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DE EXSUDATO DE *V. thyrsoidea*

Frações	Composição monossacarídica (%) ¹					
	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc ³	GlcA ²
VTh	48	3	10	10	4	24
Ph-VTh	2	-	35	3	21	39

NOTAS: Dados retirados de Wagner *et al.* (2008)

¹ Hidrólise com TFA 2 M, 100 °C durante 8h. Monossacarídeos derivados a alditóis acetato e analisados por GC-MS.

² O teor de ácido urônico foi determinado pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

³ Derivado da glucuronolactona originada a partir de GlcA durante a etapa de hidrólise do polissacarídeo.

Ao analisar o perfil de eluição obtido por HPSEC, do polissacarídeo parcialmente hidrolisado (Ph-VTh) (FIGURA 10), percebe-se que a hidrólise foi efetiva em degradar parcialmente o polissacarídeo nativo (VTh), pois o tempo de eluição de Ph-VTh é superior ao do VTh, e sabe-se que moléculas menores eluem mais lentamente em colunas de gel permeação. Esta observação foi confirmada após a determinação da M_w de Ph-VTh, que foi de 58.250 g/mol ($dn/dc = 0,086$), enquanto VTh tem M_w de 92.500 g/mol ($dn/dc = 0,212$).

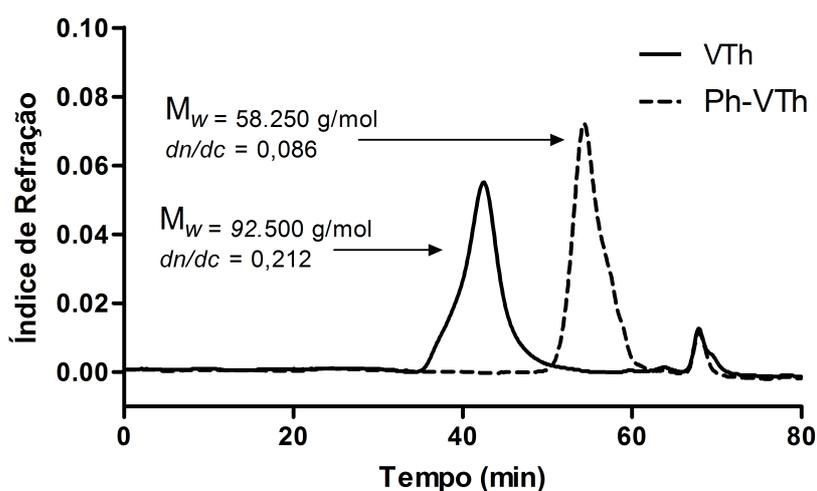


FIGURA 10 - PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC DOS POLISSACARÍDEOS NATIVO (VTh) E HIDROLISADO (Ph-VTh) DE *V. thyrsoidea*, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO
 NOTA: * M_w e dn/dc retirados de Wagner *et al.* (2008)

6.1.2 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O RMN baseia-se na observação de que núcleos magnéticos como ^1H e ^{13}C podem absorver energia em frequências características. Cada molécula tem um espectro de RMN característico, e uma das grandes vantagens dessa técnica é seu caráter não destrutivo (VASCONCELOS, 2009). Existem várias formas de aquisição de um espectro de RMN, a escolhida para esse trabalho foi a que gera mapas de correlação do tipo HSQC-editado ($^{13}\text{C}/^1\text{H}$).

O mapa de correlação do tipo HSQC-editado gerado para VTh mostra sinais na região anomérica característicos de $\alpha\text{-L-Araf}$ (δ 106,8/5,16, 107,1/5,13 e 108,2/5,43 ppm) (FIGURA 11A), o monossacarídeo majoritário presente na estrutura deste polissacarídeo (TABELA 2). É observada também a correlação 53,7/3,82 referente a grupo metil-éster de unidades de ácido glucurônico.

No HSQC referente à fração obtida após hidrólise ácida parcial (Ph-VTh; FIGURA 11B) percebe-se que correlações $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ de unidades de $\alpha\text{-L-Araf}$ e do grupo metil-éster de unidades de GlcA não estão presentes, indicando a remoção destes pela hidrólise. Neste HSQC são evidenciadas correlações $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ em δ 101,6/4,44 e 101,6/4,47 ppm correspondentes ao C1/H1 de unidades de $\beta\text{-D-GlcpA}$ e a correlação $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ em δ 98,3/5,36 ppm de C1/H1 de unidades de $\alpha\text{-D-Manp}$.

Também são observadas correlações $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ em δ 77,4/4,12 (C2/H2) e 76,5/3,75 ppm (C4/H4) de unidades de α -D-Manp 2-O-substituídas e de β -D-GlcpA 4-O-substituídas, respectivamente. Correlações muito semelhantes foram observadas para o polissacarídeo obtido por hidrólise ácida parcial da glicoglucuronomanana da goma de exsudato de *Vochysia tucanorum* (WAGNER *et al.*, 2007). No HSQC de Ph-VTh também são observadas correlações de $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ relativas ao C1/H1 de terminais redutores de α -D-Manp e β -D-Manp em δ 91.5/5,24 e 93.6/4,92 ppm, respectivamente, em acordo com sinais observados por Wagner *et al.* (2004), analisando o oligossacarídeo β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)- α , β -D-Manp derivado da glicoglucuronomanana da goma de exsudato de *Vochysia lehmannii*. Os resultados de HSQC obtidos para Ph-VTh estão coerentes com uma estrutura polissacarídica constituída por unidades repetitivas do dissacarídeo \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow , conforme descrito por Wagner *et al.* (2008). Esta estrutura corresponde à cadeia principal da glicoglucuronomanana da goma de exsudato de *V. thyrsoidea*.

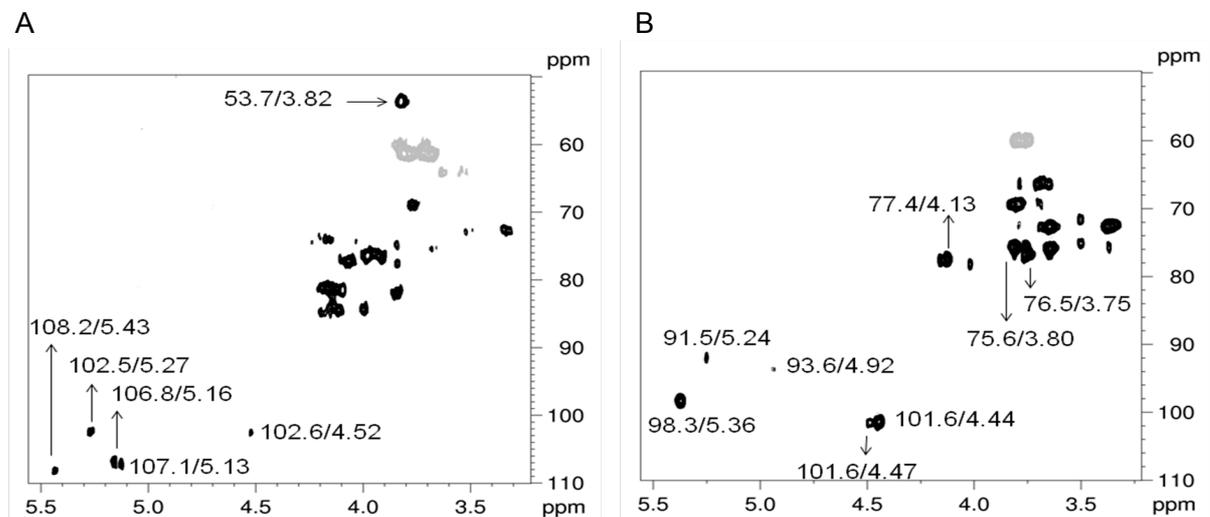


FIGURA 11 - ESPECTROS DE HSQC-editado DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS NATIVA (VTh) (A) E HIDROLISADA (Ph-VTh) (B) DA GOMA DE EXSUDATO DE *V. thyrsoidea*
 NOTA: Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em ppm

6.2 POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS

6.2.1 Processo de Sulfatação Química e Determinação do Grau de Substituição (DS)

A sulfatação química de polissacarídeos é um dos processos mais utilizados para obtenção de análogos da heparina (ARAÚJO *et al.*, 2013). A literatura descreve diversos reagentes que podem ser utilizados na reação de sulfatação química quando se trata de polissacarídeos, como por exemplo: complexos de trióxido de enxofre (SO₃) e piridina (MESTECKHINA; EGOROV; SHCHERBUKHIN, 2006; WU *et al.*, 1998), ácido piperidina-*N*-sulfônico e DMSO (MIHAI; MOCANU; CARPOV, 2001; YOSHIDA *et al.*, 1993), sulfato de metil-sódio e metil-piridínio (TAKANO *et al.*, 2000) e o ácido clorossulfônico e piridina (O'NEILL, 1955). Os solventes mais usados nesses processos são a piridina, formamida, DMF e DMSO (YANG, *et al.*, 2003).

Dentre os reagentes mais citados para sulfatação química, o ácido clorossulfônico (HSO₃Cl) e a piridina são os mais usados, pois estão relacionados com maior grau de substituição (DS) e rendimento (JINDAL *et al.*, 2013; WANG; LI; CHEN, 2009). A proporção molar do agente sulfatante em relação às hidroxilas livres do polissacarídeo a ser sulfatado, a temperatura e o tempo de reação são considerados os fatores fundamentais para regular o número de grupos sulfato introduzidos por unidade monomérica (JINDAL *et al.*, 2013; MESTECKHINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

Lu *et al.* (2012) e Yang *et al.* (2003) relatam a dificuldade encontrada em aplicar o método certo numa primeira tentativa, pois polissacarídeos podem apresentar solubilidades e conformações distintas em diferentes solventes e um método de sulfatação aplicado com sucesso a um determinado polímero pode não ser aplicável a outro. O método de sulfatação escolhido para esse estudo foi o método de O'NEILL (1955), que emprega ácido clorossulfônico e piridina. O uso do ácido clorossulfônico como agente sulfatante apresenta certas desvantagens, uma delas é a dificuldade de manuseá-lo, por ser um reagente tóxico e cáustico (JINDAL *et al.*, 2013).

Uma maneira de aumentar o grau de substituição por grupos sulfato (DS) é através do aumento da temperatura da reação para 65-70 °C, no entanto o polissacarídeo pode ser degradado por hidrólise (O'NEILL, 1955). Para evitar a degradação dos polissacarídeos, as reações de sulfatação foram realizadas em banho de gelo.

Outra forma de aumentar o DS é através do aumento na proporção de ácido clorosulfônico utilizado na reação. Alguns autores utilizaram várias proporções a fim de conseguir uma de maior representatividade frente à atividade biológica. Lu *et al.* (2012) utilizaram diferentes razões entre o volume do ácido e da amostra e Jindal *et al.* (2013) utilizaram de 3 a 10 mols de ácido clorossulfônico/mol de OH livre em suas análises. Nesse trabalho foi utilizada apenas a proporção de 10 mols de ácido clorossulfônico/mol de OH livre. A piridina, utilizada como catalizador da reação, possui um par de elétrons disponível que possibilita a formação de pontes de hidrogênio com as hidroxilas livres dos polissacarídeos, resultando em um aumento da nucleofilia desses grupamentos, fazendo com que estes sejam mais reativos (HAINES, 1976).

Essa proporção de ácido clorossulfônico foi suficiente para gerar um DS de 0,20 e 0,24, para o polissacarídeos nativo sulfatado (VThS) e polissacarídeo hidrolisado sulfatados (Ph-VThS), respectivamente, o que corresponde ao número de grupos sulfato substituintes por unidade monossacarídica (TABELA 3). Os baixos valores de DS podem ser decorrentes de uma sulfatação dificultada pela conformação assumida por esses polissacarídeos. Além disso, as cargas negativas do grupo ácido das moléculas podem ter impedido a entrada de novas cargas negativas, como as apresentadas pelo grupo sulfato.

O DS foi determinado empregando-se a fórmula descrita por Whistler e Spencer (1964), sendo, primeiramente, quantificado o teor de sulfato dos polissacarídeos pelo método turbidimétrico de Dodgson e Price (1962). Este método envolve a hidrólise ácida do polissacarídeo, seguida pela determinação do sulfato inorgânico liberado, o qual é determinado espectrofotometricamente como sulfato de bário. É um método vantajoso pois é simples e rápido de ser realizado, necessita de poucos materiais e apresenta poucos interferentes. A gelatina utilizada na metodologia serve como estabilizador da turbidez gerada quando o sulfato da amostra reage com o cloreto de bário formando sulfato de bário, que fica suspenso e permite sua leitura em espectrofotômetro (DODGSON; PRICE, 1962).

TABELA 3 - RENDIMENTO E DS DOS POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS

Polissacarídeo	Sigla	Peso (mg) ^a	mols HSO ₃ Cl/mol de OH livre	Polissacarídeo sulfatado	Peso (mg) ^b	% Sulfato	DS ^c
Nativo	VTh	400	10	VThS	490	12	0,20
Hidrolisado	Ph-VTh	400	10	Ph-VThS	560	12,80	0,24

NOTAS: ^a Quantidade de polissacarídeo utilizado para sulfatação química

^b Quantidade de polissacarídeo recuperado após o processo de sulfatação química

^c Grau de substituição por grupos sulfato

A verificação da presença de grupos sulfato e a determinação do DS em moléculas candidatas a agentes anticoagulantes e antitrombóticas são importantes, uma vez que essas atividades biológicas resultam da interação das cargas negativas dos grupos sulfato, com cargas positivas de sequências peptídicas de proteínas reguladoras do processo de coagulação sanguínea (DORE *et al.*, 2013; MARTINICHEN, 2005; SCHOEN *et al.*, 1990). Essas atividades são dependentes de muitos fatores, como o tipo de monossacarídeo, ligação glicosídica, conformação da cadeia polimérica e o peso molecular, mas geralmente ela é melhorada com o aumento do DS do polissacarídeo (LIANG *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2012; MAAS *et al.*, 2012).

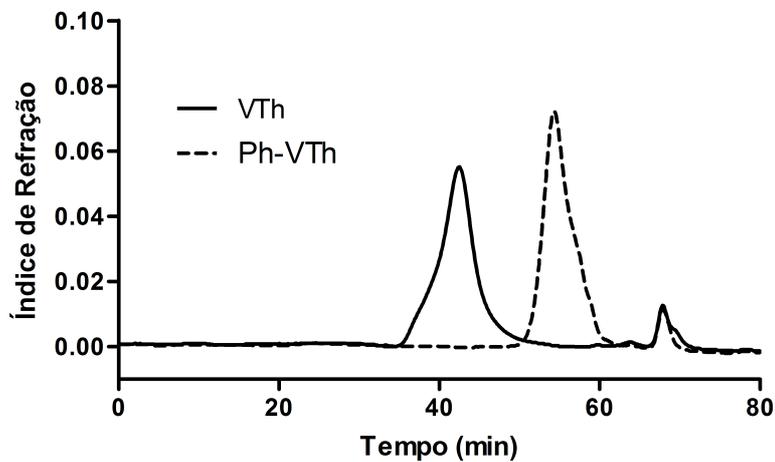
6.3 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS

6.3.1 Análise da Homogeneidade

Algumas condições do processo de sulfatação permitem a degradação do polissacarídeo, já que se trabalha com um ácido forte. No entanto, reações bem controladas podem impedir essa situação, gerando um polissacarídeo sulfatado e sem degradação. O total de polissacarídeo recuperado após a sulfatação (TABELA 3) pode ser um indício de que não houve degradação durante o processo, mas o perfil de eluição por HPSEC é a melhor forma de se avaliar esse fenômeno.

Os perfis de eluição dos polissacarídeos antes e após a sulfatação são muito similares e estão mostrados na Figura 12. Percebe-se que VThS apresenta um perfil de eluição com menor intensidade e mais alargado na base. Essa maior polidispersão é devida à presença de um ombro no início do pico de VThS, provavelmente decorrente da formação de agregados. Já Ph-VThS se apresenta homogêneo e menos polidisperso que Ph-VTh. Esses resultados sugerem que não houve degradação dos polissacarídeos no processo de sulfatação.

A



B

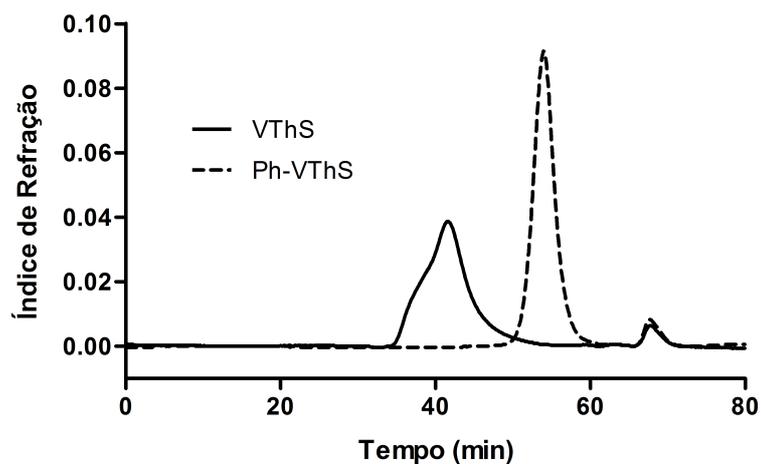


FIGURA 12 - PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC DOS POLISSACARÍDEOS VTh E Ph-VTh (A) E VThS E Ph-VThS (B), UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI)

6.3.2 Composição Monossacarídica e Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para determinar de quais monossacarídeos um polissacarídeo é constituído é necessária sua despolimerização por hidrólise ácida ou enzimática. Estes procedimentos produzem, monossacarídeos que são posteriormente analisados por métodos cromatográficos. Diferentes tipos de ácidos podem ser utilizados para a hidrólise de carboidratos, como HCl e H₂SO₄ (VASCONCELOS, 2009). Neste trabalho a hidrólise foi realizada com ácido trifluoracético (TFA), que tem se mostrado efetivo para polissacarídeos. Uma das maiores vantagens desse ácido é a sua volatilidade, sendo facilmente removido do hidrolisado por evaporação, já os ácidos inorgânicos precisam ter suas soluções neutralizadas e deionizadas antes de serem analisados por cromatografia gasosa ou líquida (VASCONCELOS, 2009; JOHANSSON *et al.*, 2004).

A composição monossacarídica dos polissacarídeos sulfatados está apresentada na Tabela 4, onde se constata que VThS é composto majoritariamente por Ara, Man e GlcA (34:33:20), e Ph-VThS por Man e GlcA (52:48).

Comparando-se a composição monossacarídica dos polissacarídeos não sulfatados (TABELA 2) e dos polissacarídeos sulfatados (TABELA 4), a principal diferença observada é na proporção de arabinose e manose de VTh e VThS. VTh apresenta 48% de Ara e 10% de Man, enquanto VThS apresenta 34% de Ara e 33% de Man. Isso pode ser justificado pela hidrólise de unidades de arabinose do polissacarídeo durante o processo de sulfatação química com ácido clorossulfônico. As ligações glicosídicas entre unidades de arabinose são mais suscetíveis à hidrólise ácida do que as ligações entre outras unidades. Uma vez que o teor de arabinose diminui, proporcionalmente o teor de manose aumenta no polissacarídeo sulfatado.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES SULFATADAS OBTIDAS A PARTIR DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DE EXSUDATO DE *V. thyrsoidea*

Frações	Composição monossacarídica (%) ¹				
	Ara	Xyl	Man	Gal	GlcA ²
VThS	34	2	33	11	20
Ph-VThS	-	-	52	-	48

NOTAS:¹Hidrólise com TFA 2 M, 100 °C durante 8h. Monossacarídeos derivados a alditóis acetato e analisados por GC-MS

²O teor de ácido urônico foi determinado pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991)

Os mapas de correlação ¹³C/¹H (HSQC-editado) dos polissacarídeos não sulfatados e dos respectivos polissacarídeos sulfatados são muito semelhantes (FIGURA 13). O aparecimento do sinal em δ 67,0/4,18 ppm (invertido no editado) em VThS pode ser decorrente de sulfatação em C-5 de unidades de arabinose ou C-6 de unidades de manose ou galactose. E, o deslocamento do sinal em δ 75,6/3,80 ppm em Ph-VTh para δ 76,2/3,68 ppm em Ph-VThS pode ser devido à sulfatação de C-3 de unidades de ácido glucurônico. De acordo com Wagner *et al.* (2007), a correlação C3/H3 de unidades de GlcA é observada em δ 75,6/3,80 ppm.

O fato de os mapas de correlação ¹³C/¹H obtidos para os polissacarídeos antes e após a sulfatação serem similares pode se justificado pelo baixo grau de substituição (DS) dos polissacarídeos sulfatados (Tabela 2).

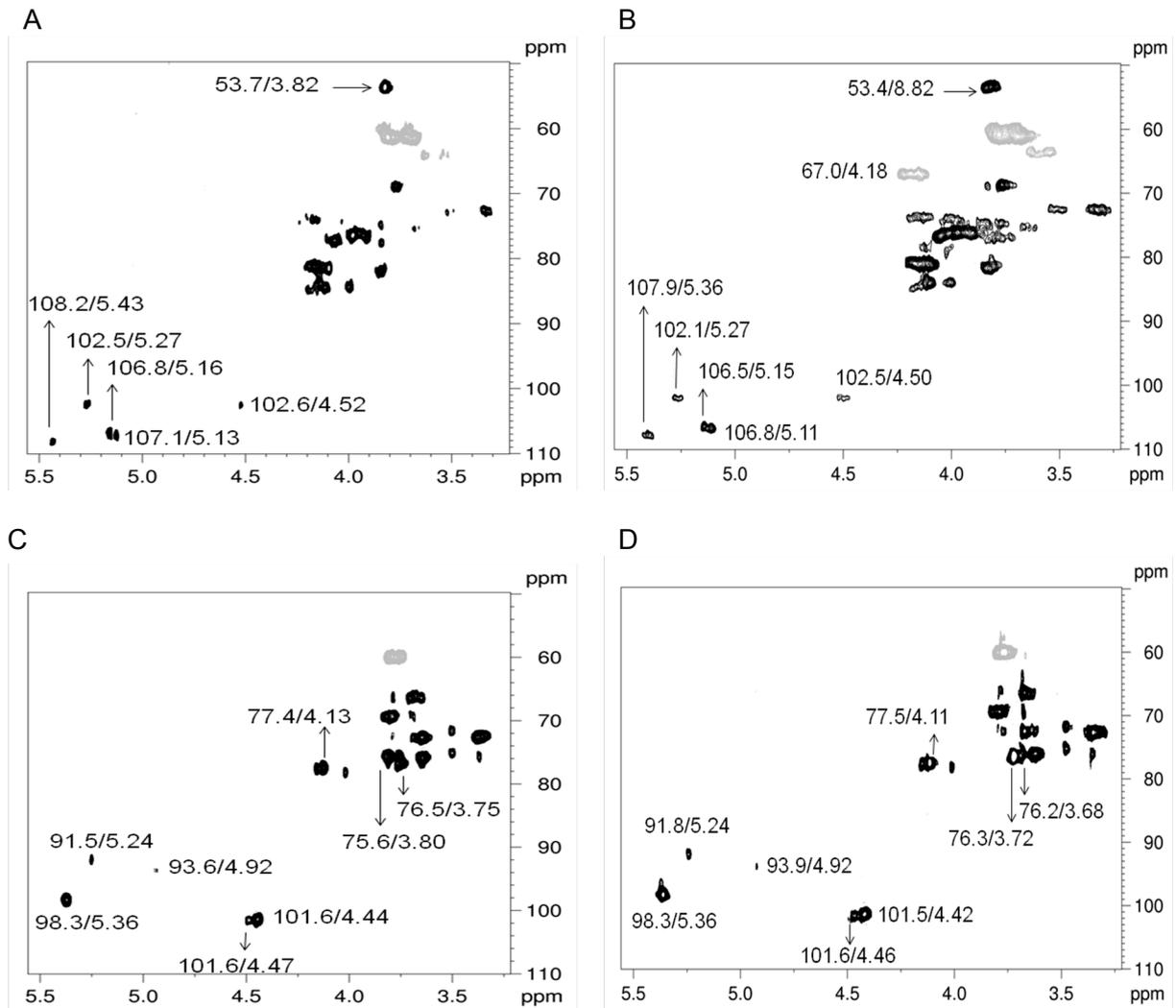


FIGURA 13 - ESPECTROS DE HSQC-editado DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS QUIMICAMENTE SULFATADAS E NÃO SULFATADAS DA GOMA DE EXsudATO DE *V. thyrosidea* NOTAS: Polissacarídeo nativo (VTh) em A; polissacarídeo nativo quimicamente sulfatado (VThS) em B; polissacarídeo hidrolisado (Ph-VTh) em C e polissacarídeo hidrolisado quimicamente sulfatado (Ph-VThS) em D. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em ppm

6.3.3 Análise de Metilação

A análise de metilação é uma ferramenta importante para auxiliar na caracterização estrutural de polissacarídeos, pois ela torna possível a visualização de como a molécula está ligada e/ou substituída. Ela envolve a metilação das hidroxilas livres do polímero, seguida de hidrólise, que irá gerar monossacarídeos parcialmente metilados, que serão reduzidos a alditóis parcialmente metilados e,

então, acetilados, tornando os compostos voláteis para que possam ser analisados por cromatografia gasosa (PAZUR, 1994).

Os resultados dessa análise mostraram um aumento de derivados metilados para as amostras sulfatadas (TABELA 5). A entrada de grupos sulfato no polissacarídeo ocasiona um aumento de substituições na molécula, o que é demonstrado pelo maior número de derivados metilados presentes na análise de metilação.

Os derivados metilados de glucose presentes na análise de metilação (TABELA 5) estão ausentes nas amostras não carboxirreduzidas dos polissacarídeos (dados contidos em Wagner *et al.*, 2008). Portanto, estes derivados metilados de glucose referem-se às unidades de ácido glucurônico carboxirreduzidas.

Uma vez que as unidades de α -D-Manp e β -D-GlcpA dos polissacarídeos em estudo (nativo e hidrolisado) são, majoritariamente, 2-O- e 4-O-ligadas, respectivamente, as posições O-2 da manose e O-4 do ácido glucurônico não foram consideradas como pontos possíveis de sulfatação.

De acordo com a análise de metilação é possível indicar que a sulfatação ocorreu, preferencialmente, na posição O-5 das unidades de arabinose no polissacarídeo nativo sulfatado, e na posição O-6 das unidades de manose no polissacarídeo hidrolisado sulfatado. Contudo, outros pontos de sulfatação foram evidenciados em ambos os polissacarídeos.

TABELA 5 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES CARBOXIRREDUZIDAS NÃO SULFATADAS E SULFATADAS OBTIDAS A PARTIR DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DE EXSUDATO DE *V. thyrsoidea*

Derivado metilado ^b	Mol (%) ^a		Posição de sulfatação	Mol (%) ^a		Posição de sulfatação
	CR ₃ VTh ¹	VThSCR ₂		Ph-VTh-CR ²	Ph-VThS-CR ₂	
2,3,5-Me ₃ -Araf	25	30	-	1	-	-
2,3,4-Me ₃ -Arap	8	4	-	-	-	-
2,5 Me ₂ -Araf	-	5	O-3	-	-	-
2,3-Me ₂ -Araf	-	17	O-5	-	-	-
2,4-Me ₂ -Arap	-	3	O-3	-	-	-
2-Me-Araf	-	4	O-3,5	-	-	-
Ara	1	3	O-2,3,5	-	-	-
2,3,4-Me ₃ -Xylp	4	-	-	-	-	-
2,3,4,6-Me ₄ -Man	-	-	-	4	-	-
3,4,6-Me ₃ -Manp	3	-	-	48	49	-
3,4-Me ₂ -Manp	-	-	-	-	8	O-6
4,6-Me ₂ -Manp	17	14	-	4	-	-
3/4-Me-Manp	-	-	-	-	4	O-4,6/3,6
Man	-	5	O-3,4,6	-	8	O-3,4,6
2,3,4,6-Me ₄ -Galp	8	1	-	2	-	-
2,4,6-Me ₃ -Galp	6	2	-	5	-	-
2,6-Me ₂ -Galp	12	4	-	-	-	-
2,3,4,6-Me ₄ -Glc ^{p*}	-	-	-	4	-	-
2,3,6-Me ₃ -Glc ^{p*}	12	5	-	32	23	-
2,6-Me ₂ -Glc ^{p*}	4	4	-	-	3	O-3
Glc ^{p*}	-	2	O-2,3,6	-	4	O-2,3,6

NOTAS: ^a Valores < 1% não incluídos

^b O-metil alditol acetato analisado por CG-MS

* O-metil alditol acetato ausente nas amostras não carboxirreduzidas (não mostrado), ou seja, são derivados originados a partir de unidades de GlcA

^{1,2} Dados retirados de Wagner *et al.* (2008)

Existem muitas especulações quanto à posição de inserção de grupos sulfato e sua relação com a atividade biológica. Para Gracher (2010), Alban, Schauerte e Franz (2002), o grupo OH-2 de glucanas sulfatadas é o grupo mais favorável a sulfatação, seguido por OH-3. Em polissacarídeos ácidos, esses são os grupos que geram atividade anticoagulante elevada, quando sulfatados (KAMIDE *et al.*, 1983). Para Chen *et al.* (2013) a substituição em OH-3 de fucoses sulfatadas, mostrou bons resultados na atividade antitrombótica, mas não na atividade anticoagulante, enquanto que em OH-2 se mostrou igualmente relevante para ambas as atividades. Outros autores afirmam que a chave do bom desempenho do

polissacarídeo está relacionada à sulfatação do grupo OH-6 (JIANG *et al.*, 2015; WANG, *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2009; YANG, *et al.*, 2005).

6.4 ANÁLISES *IN VITRO*

6.4.1 Determinação da Potência Anticoagulante dos Polissacarídeos

Um dos passos comumente utilizado para determinar a atividade anticoagulante dos polissacarídicos é a construção de uma curva de calibração a partir de um padrão de heparina com atividade conhecida (CHEN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013; YOON *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2005). Neste trabalho o padrão de heparina utilizado apresenta 200,47 UI/mg (6th *International Standard* 2009). O logaritmo dos tempos de aPTT *versus* Unidades Internacionais de heparina (UI) irá fornecer a reta (FIGURA 14) necessária para determinar a potência dos polissacarídeos.

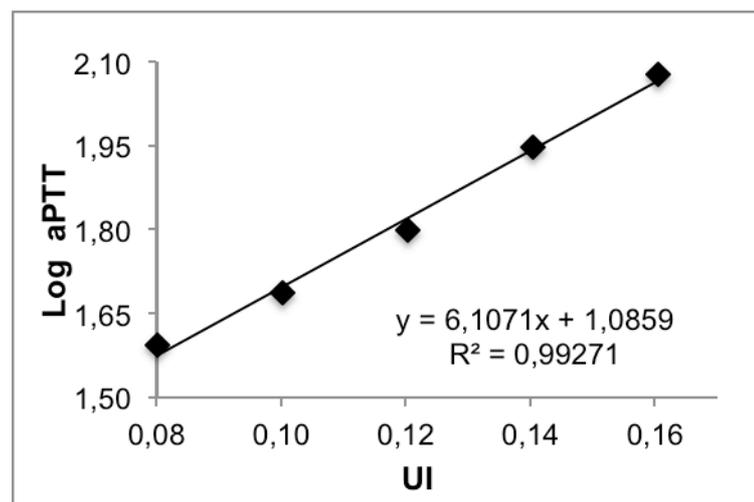


FIGURA 14 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DE HEPARINA, PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

NOTA: Padrão de heparina contendo 200,47 UI/mg (6th *International Standard*, 2009)

Os resultados de aPTT mostraram que a presença de grupos sulfato é essencial para a atividade anticoagulante, uma vez que os polissacarídeos desprovidos de grupos sulfatos (VTh e Ph-VTh) não apresentaram efeito sobre a coagulação do plasma, enquanto os polissacarídeos sulfatados VThS e Ph-VThS apresentam atividade anticoagulante de 8,59 e 2,67 UI/mg, respectivamente. Também foi verificado que aumentando a quantidade de VThS e Ph-VThS no experimento, aumenta o tempo de aPTT (TABELA 6).

Uma vez que o polissacarídeo Ph-VThS é constituído por unidades de monossacarídeos ácidos e neutros alternadas, uma característica observada na heparina, acreditava-se que sua atividade anticoagulante seria superior à de VThS. Contudo, um resultado oposto foi observado, sugerindo que a presença das unidades de arabinose sulfatadas, principalmente, na posição O-5, favorece a atividade anticoagulante.

TABELA 6 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DE *V. thyrsoidea*

Frações	Salina	VTh	VThS	Ph-VTh	Ph-VThS		
µg	-	100	12,5	25	100	50	75
aPTT ¹ (s)	25,1	25,45	75,75	131,5	26,4	102,45	137,3
Atividade anticoagulante média ² (UI/mg)	-	-	8,59	-	-	2,67	

NOTA: ¹ média de quadruplicatas

² calculado a partir do log dos tempos médios de aPTT substituído na equação da reta gerada pela curva padrão de heparina da Figura 14

Os polissacarídeos VThS e Ph-VThS apresentaram semelhantes DS (0,20 e 0,24, respectivamente - TABELA 2), mas atividades anticoagulantes distintas, indicando que não somente a existência de grupos sulfato, mas também a composição monossacarídica, o tamanho da molécula, e a conformação do polissacarídeo como um todo têm grande relevância na sua atividade.

6.4.2 Ensaio de Inibição da Atividade Anticoagulante dos Polissacarídeos com Protamina

Tão importante como encontrar um polissacarídeo com atividade anticoagulante, é encontrar um agente que possa reverter seus efeitos. No caso da heparina utiliza-se a protamina para inibir sua atividade.

Neste trabalho também foi avaliado se a protamina é capaz de neutralizar o efeito anticoagulante de VThS e Ph-VThS. A avaliação foi realizada pelo teste de aPTT, utilizando 0,15 UI de cada polissacarídeo (VThS, Ph-VThS e heparina), na presença e na ausência de protamina. Duas quantidades de protamina foram testadas (1 e 2 µg).

A protamina, nas duas concentrações testadas, foi eficiente em inibir completamente a atividade anticoagulante da heparina (FIGURA 15). Já para os polissacarídeos quimicamente sulfatados a inibição da atividade não foi completa. Mesmo na presença de protamina, VThS e Ph-VThS apresentaram efeito anticoagulante. Contudo, as atividades de VThS e Ph-VThS foram significativamente reduzidas com 1 µg de protamina (FIGURA 15A) e, reduziram ainda mais com 2 µg (FIGURA 15B). Estes resultados mostraram que é possível controlar os efeitos anticoagulantes de VThS e Ph-VThS por meio do mesmo antagonista da heparina.

Uma vez que VThS e Ph-VThS apresentam uma atividade anticoagulante consideravelmente menor do que a heparina (em UI/mg), a quantidade em peso de VThS e Ph-VThS necessária para se obter 0,15 UI é muito maior do que a quantidade de heparina. Portanto, a relação protamina/polissacarídeo (p/p) é muito menor para os polissacarídeos quimicamente sulfatados do que para a heparina. Além disso, a diferença de massa molar existente entre VThS, Ph-VThS e heparina, influencia o número de moléculas presentes em um determinado peso destes materiais. Assim, as diferenças observadas na eficiência da protamina em inibir o efeito anticoagulante de VThS, Ph-VThS e da heparina pode ter sido uma consequência do diferente número de moléculas presentes no ensaio realizado, ou seja, nas diferentes relações entre mols de polissacarídeo/mols de protamina. Embora esta hipótese não possa ser comprovada neste momento, os resultados obtidos (FIGURA 15) demonstram que a protamina é capaz de inibir o efeito anticoagulante de VThS e Ph-VThS.

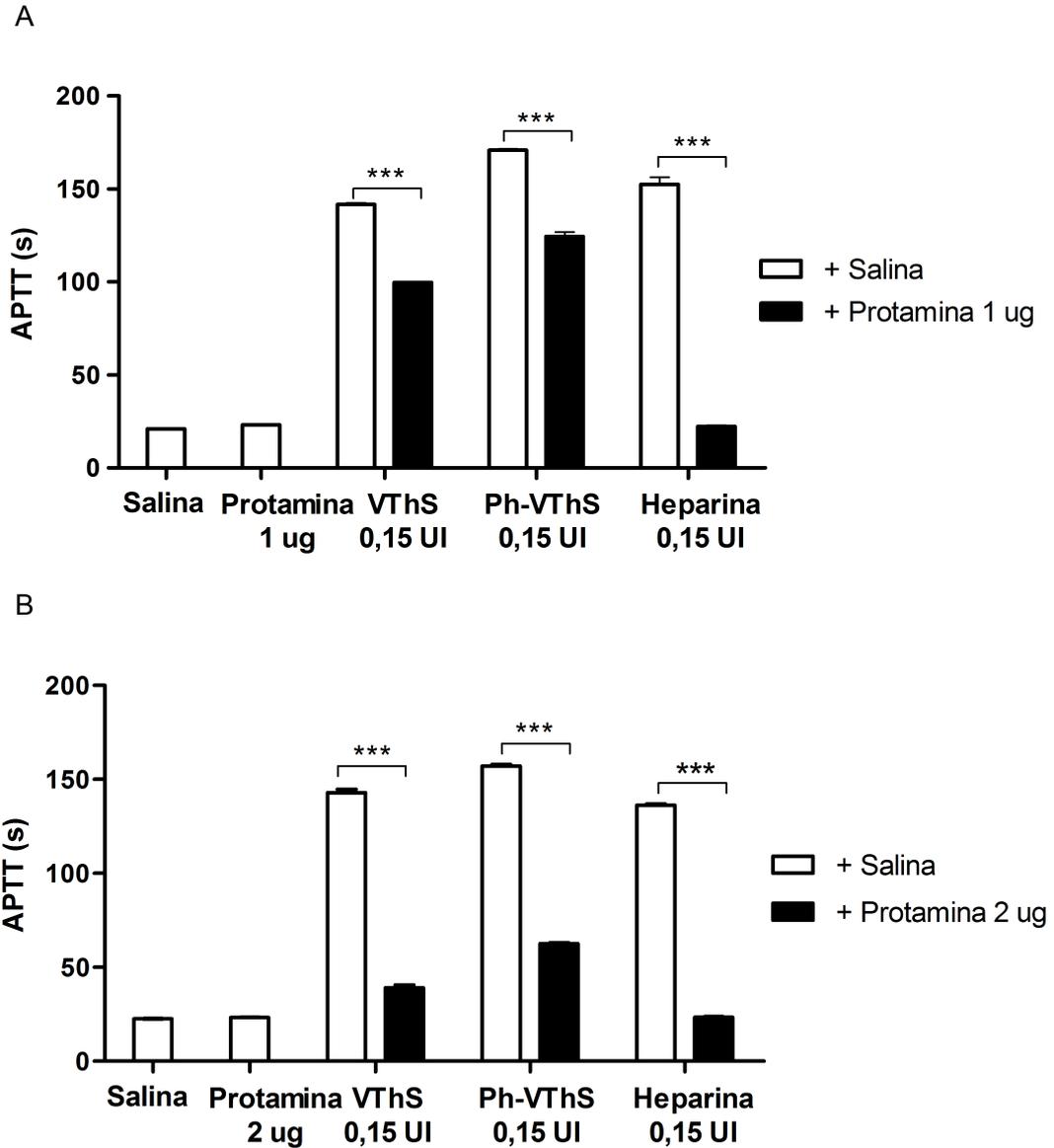


FIGURA 15 - ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE POR PROTAMINA
 NOTAS: A) aPTT dos polissacarídeos na presença de salina ou 1 µg de protamina. B) aPTT dos polissacarídeos na presença de salina ou 2 µg protamina. Os resultados foram expressos como a média do aPTT (s) ± EPM (n = 4). *** p < 0,001

6.4.3 Determinação do Mecanismo de Ação Anticoagulante

6.4.3.1 Ensaio de Inibição da α -Trombina e Fator Xa na Presença de AT OU HCII

A heparina atua como anticoagulante e antitrombótico por catalisar e potencializar a ação inibitória exercida pelas serpinas, como a antitrombina (AT) e o

cofactor II de heparina (HCII), sobre as enzimas da cascata de coagulação, principalmente α -trombina e fator Xa.

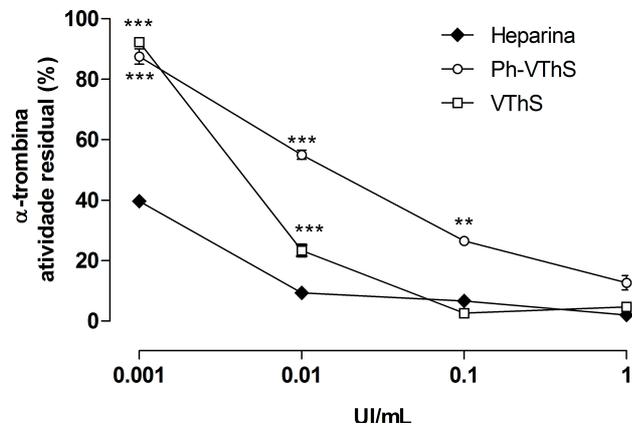
O estudo do mecanismo de ação anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados está baseado no modo de ação da heparina. Para verificar se os polissacarídeos também atuam na potencialização das serpinas, eles foram incubados com α -trombina ou fator Xa, na presença ou ausência de AT ou HCII, e a atividade residual dessas serino proteases foi determinada pelo uso de um substrato cromogênico específico.

Nas suas maiores concentrações (1 UI/mL), os polissacarídeos sulfatados foram eficientes em inibir a α -trombina na presença de AT, com efeito semelhante ao da heparina. No entanto, VThS foi mais eficiente, pois na concentração de 0,1 UI/mL ele conseguiu inibir a atividade da α -trombina em aproximadamente 100%, assim como a heparina (FIGURA 16A).

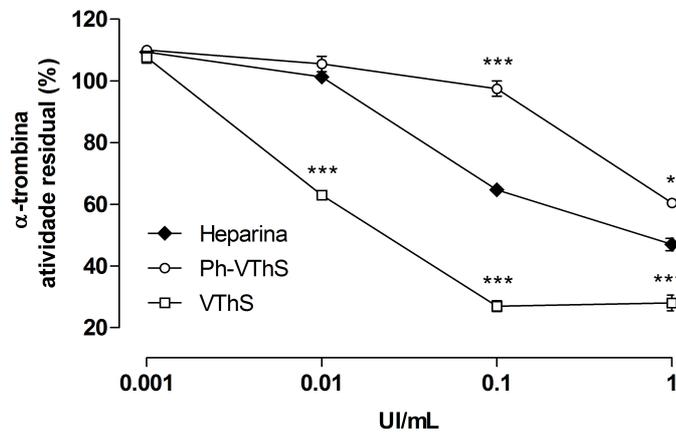
A heparina favorece a interação do HCII com a α -trombina somente em concentrações altas (TOLLEFSEN, 2007). Nas concentrações testadas, VThS apresentou melhor desempenho que a heparina em inibir a α -trombina na presença de HCII (FIGURA 16B). Este resultado sugere que em indivíduos com deficiência de AT, o polissacarídeo VThS poderia ser utilizado como anticoagulante com uma eficiência superior ao da heparina. Já Ph-VThS se mostrou menos eficiente que a heparina em todas as concentrações. Na maior concentração avaliada, Ph-VThS foi capaz de inibir a α -trombina em 40%, contra 50% da heparina e 70% de VThS, aproximadamente.

Na avaliação da atividade do fator Xa em presença de AT a heparina foi eficiente em todas as concentrações testadas, inibindo aproximadamente 100% da atividade do fator Xa, resultado alcançado por VThS apenas na sua maior concentração (1 UI/mL). VThS foi capaz de reduzir a atividade do fator Xa em mais de 90% na concentração de 0,1 UI/mL, no entanto foi estatisticamente diferente da heparina. O melhor resultado alcançado por Ph-VThS foi de 50% de inibição do fator Xa, na concentração de 1 UI/mL (FIGURA 16C).

A



B



C

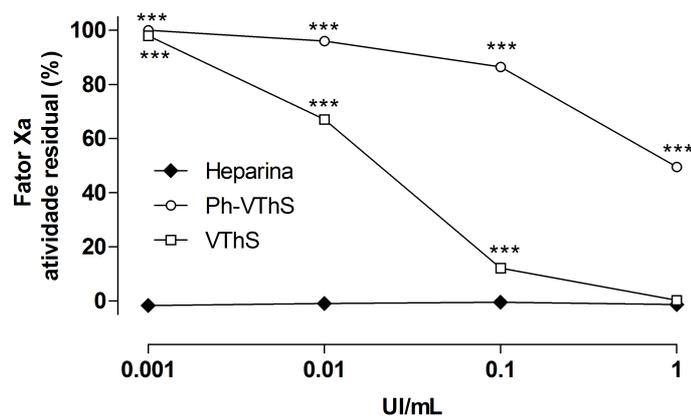


FIGURA 16 - EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS NA INIBIÇÃO DA α -TROMBINA E FATOR Xa NA PRESENÇA DE AT OU HCII

NOTAS: A) α -Trombina na presença de AT, B) α -Trombina na presença de HCII, C) Fator Xa na presença de AT. A absorbância obtida a 405 nm na ausência das amostras (controle negativo - dados não mostrados) foi considerada como 100% de atividade da α -trombina ou do fator Xa. Os resultados foram expressos com a média \pm EMP ($n = 3$), com $p < 0.5^*$, $< 0.01^{**}$ ou $< 0.001^{***}$ quando comparados, por Tukey, com o grupo controle positivo (heparina)

6.4.3.2 Ensaio de Inibição da α -Trombina e Fator Xa na Ausência de AT OU HCII

A heparina é o padrão de comparação na determinação de mecanismos anticoagulantes de polissacarídeos sulfatados. Sua atividade deve-se a uma sequência pentassacarídica específica, a qual se liga a AT, favorecendo a ligação deste com a α -trombina e com o fator Xa (LINDAHL *et al.*, 1979), ou também favorecendo a interação do HCII com a α -trombina, quando em altas concentrações (TOLLEFSEN, 2007). Portanto, o efeito da heparina é conhecido como serpino-dependente ou indireto.

Mesmo quando em altas concentrações (10 UI/mL), nenhum dos polissacarídeos sulfatados foi capaz de inibir diretamente a α -trombina ou o fator Xa a ponto de cessar suas atividades, ou seja, na ausência das serpinas (AT e HCII) os polissacarídeos, assim como heparina, não apresentam atividade (FIGURA 17), suportando a hipótese de um mecanismo serpino-dependente.

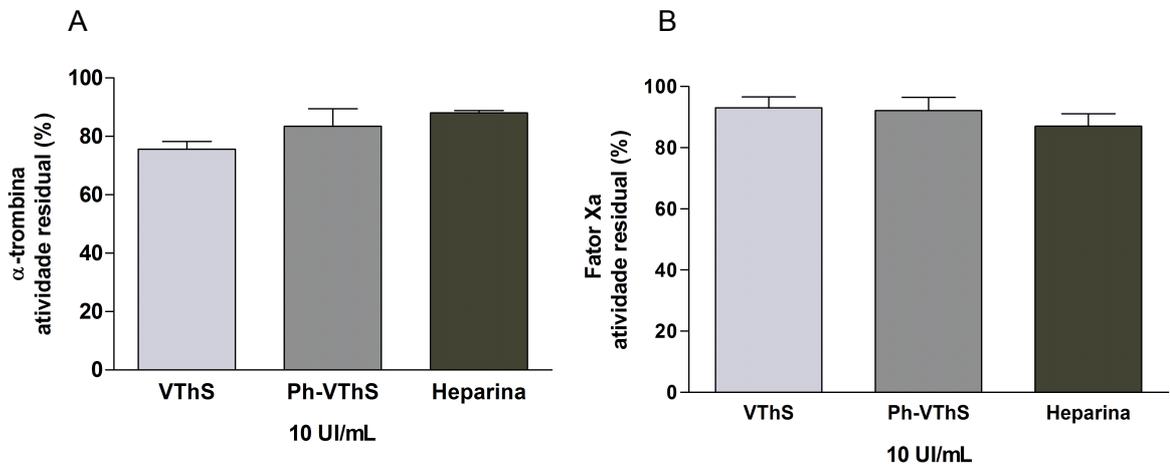


FIGURA 17 - EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS NA INIBIÇÃO DA α -TROMBINA (A) E FATOR Xa (B) NA AUSÊNCIA DE AT OU HCII

NOTAS: A absorbância obtida a 405 nm na ausência das amostras (controle negativo - dados não mostrados) foi considerada como 100% de atividade da α -trombina ou do fator Xa. Os resultados foram expressos com a média \pm EMP (n = 3) e comparados, por Tukey, com o grupo controle positivo (contendo heparina)

Maas *et al.* (2012) estudaram uma pectina cítrica quimicamente sulfatada e observaram, assim como para VThS, Ph-VThS e heparina, um mecanismo serpino-dependente na inibição da α -trombina e do fator Xa. A dependência de serpinas

também foi constatada por Mourão e Pereira (1999) quando testaram a atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de equinodermos.

Fucanas sulfatadas de *Laminaria cichorioides* (YOON *et al.*, 2007) inibiram a atividade da α -trombina e do fator Xa mediada por AT. Na presença de HCII, a inibição da α -trombina exigiu menor concentração do polissacarídeo que para AT.

Polissacarídeos podem apresentar diferentes mecanismos anticoagulantes, como o caso do polissacarídeo quimicamente sulfatado isolado de basidiomiceto que inibiu a α -trombina mediada pela AT e HCII, mas não teve efeito sobre a inibição do fator Xa na presença de AT (GRACHER *et al.*, 2010).

Já a pectina cítrica de alto e baixo peso molecular quimicamente sulfatada por Cipriani *et al.* (2009) mostrou uma ação direta ou independente, apresentando efeitos inibitórios sobre α -trombina e fator Xa na ausência de suas respectivas serpinas. Dore *et al.* (2013) isolaram fucanas sulfatadas de *Sargassum vulgare* e verificaram o mesmo efeito inibitório independente de serpinas.

6.5 ANÁLISES *IN VIVO*

Muitos modelos animais têm sido desenvolvidos a fim de testar a eficácia de agentes antitrombóticos (MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005), permitindo estudos sobre a formação de trombo, bem como de seus inibidores (HANSON; SAKARIASSEN, 1998). Dentre esses modelos podemos citar os estudados por Ku e Bae (2014), Wang *et al.* (2014), Chen *et al.* (2013), Berry *et al.* (1994), Vogel *et al.*, (1989) e Reyers *et al.* (1980). Normalmente, nestes modelos animais a formação do trombo é desencadeada pela combinação de hipercoagulabilidade e estase venosa (VOGEL *et al.*, 1989).

6.5.1 Análise da Atividade Antitrombótica: modelo de trombose venosa estase-induzida em ratos

No presente estudo, a formação do trombo foi induzida por uma combinação de estase e hipercoagulabilidade (VOGEL *et al.*, 1989; BERRY *et al.*, 1994) pela administração de tromboplastina e redução do fluxo sanguíneo por estase da veia cava em ratos. Este modelo foi escolhido por já ter um protocolo estabelecido no laboratório, pela facilidade de manuseio dos animais e por ser de mais fácil execução.

Nos experimentos de atividade antitrombótica a média dos pesos dos trombos secos dos animais que receberam apenas veículo (PBS) foi de 3,2 mg, e correspondeu a 100% de trombose.

Os polissacarídeos quimicamente sulfatados apresentaram efeito antitrombótico igual, estatisticamente, à heparina em todas as concentrações testadas, conseguindo reduzir a trombose em aproximadamente 50% na concentração de 40 UI/kg (FIGURA 18).

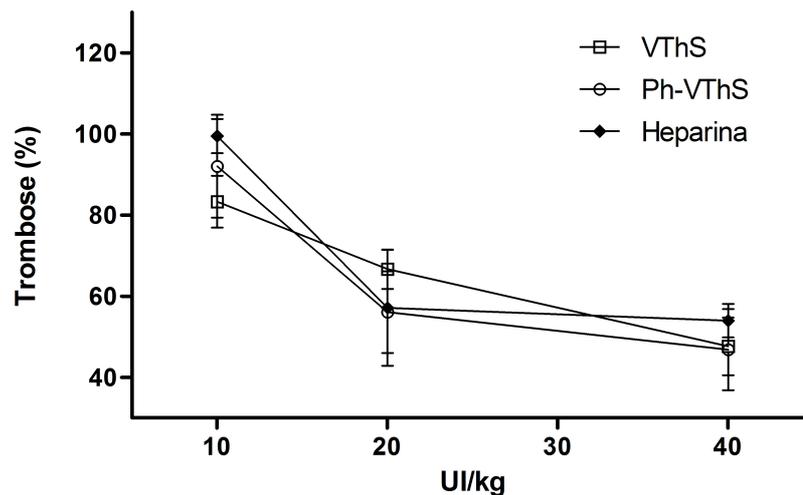


FIGURA 18 - EFEITO ANTITROMBÓTICO *IN VIVO* DOS POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS

NOTAS: Os resultados foram expressos como a média do peso do trombo \pm EMP (n = 6) em porcentagem, com 100% representando a ausência de qualquer inibição de trombose (peso do trombo com a administração de PBS). Os resultados foram comparados por Tukey, com o grupo controle positivo (contendo heparina)

A fucana sulfatada extraída de *Sargassum vulgare* por Dore *et al.* (2013) apresentou efeito similar ao da heparina quando administrada em concentrações 10 vezes maiores (10 µg/g) conseguindo reduzir em aproximadamente 80% a formação do trombo.

Chen *et al.* (2013) verificaram que diferentes polissacarídeos sulfatados de pepino-do-mar (0,5 mg/mL) conseguiram inibir a trombose em 70% mas não se equipararam à heparina, que em menor concentração evitou completamente a formação do trombo.

Martinichen-Herrero *et al.* (2005) sulfataram quimicamente uma glucana de líquen e verificaram atividade antitrombótica. Eles verificaram um efeito dose-dependente e observaram que era necessária uma concentração 5 vezes maior da glucana sulfatada (0,500 mg/kg), que de heparina, para conseguir o mesmo resultado.

Cipriani *et al.* (2009) também observaram uma resposta dose-dependente na avaliação da atividade antitrombótica da pectina cítrica quimicamente sulfatada de alto peso molecular. Na concentração de 2,0 mg/kg, a inibição foi de aproximadamente 45%, já com 3,5 mg/kg, não foi observado formação de trombo. Já a pectina cítrica quimicamente sulfatada de baixo peso molecular só conseguiu total inibição da trombose com 4,0 mg/kg, efeito gerado pela heparina na concentração de 150 µg/kg. Doses menores que 1 mg/kg apresentaram efeito protrombótico.

Gracher (2010) testou uma β-D-glucana quimicamente sulfatada com cadeia principal (1→3) ligada de *Pleurotus florida*, com DS 0,60, e verificou atividade antitrombótica, sendo que com 1 mg/kg por peso animal, a redução na formação de trombo foi de aproximadamente 73% e com 1,5 mg/kg a inibição subiu para 87%.

Gracher (2010) também sulfatou quimicamente e testou uma β-D-glucana linear (1→6) ligada de *Agaricus blazei*. O DS obtido foi de 1,3. Na concentração de 0,250 mg/kg houve redução na formação do trombo em 72% e dobrando a concentração a redução caiu para 48%. Aumentando a concentração para 1 mg/kg o efeito foi protrombótico, aumentando em 13% o peso do trombo. Já a heparina apresentou uma dose-resposta, inibindo completamente a formação do trombo com uma concentração de 0,200 mg/kg.

A heparina, quando utilizada como medicamento, é administrada ao paciente em quantidades definidas em UI. Neste estudo os efeitos antitrombóticos de VThS, Ph-VThS, bem como da heparina, foram avaliados em função das suas quantidades em UI. Na literatura foram encontrados apenas estudos que avaliavam o efeito antitrombótico em função da quantidade em peso dos polissacarídeos quimicamente sulfatados. Uma vez que as atividades anticoagulantes de VThS e Ph-VThS (8,59 e 2,67, respectivamente) são consideravelmente menores do que a da heparina (200,47 UI/mg), a quantidade em peso de VThS e Ph-VThS utilizada no experimento de atividade antitrombótica foi muito maior do que a quantidade de heparina. Contudo, os resultados obtidos demonstraram que VThS e Ph-VThS são tão eficientes quanto a heparina se o efeito antitrombótico for expresso como uma função da quantidade dos polissacarídeos em UI.

6.5.2 aPTT *Ex Vivo*

Normalmente, heparinas de baixa massa molecular mostram bons efeitos quando aplicadas subcutaneamente, pois são bem absorvidas por esta via de administração. Por outro lado, as heparinas não-fracionadas são administradas por via endovenosa (NOGUEIRA, 2013).

Como controle positivo foi utilizado o Clexane (300 UI/kg), uma heparina comercial de baixa massa molecular. A média dos tempos de aPTT para o controle negativo (PBS) foram de 18,83 e 20,20 segundos, para as coletas de sangue realizadas na segunda e terceira hora após a administração do PBS, respectivamente.

O teste foi padronizado em UI, sendo necessários 40,6 mg de VThS e 131,11 mg de Ph-VThS para se ter 500 UI e 20,49 mg de clexane para se obter 300 UI.

A absorção dos polissacarídeos foi comprovada pelo aumento no aPTT *ex vivo* em relação ao grupo controle negativo. A administração subcutânea de VThS praticamente não alterou o aPTT dos animais, indicando ausência de absorção. Por outro lado a administração subcutânea de Ph-VThS aumentou o aPTT dos animais em 106 e 36% na 2 e 3h, respectivamente, em relação ao controle negativo. A

menor massa molecular de Ph-VThS em relação à VThS pode justificar este resultado. Como esperado, o Clexane também aumentou o aPTT dos animais, 2 e 3h após sua administração (FIGURA 19).

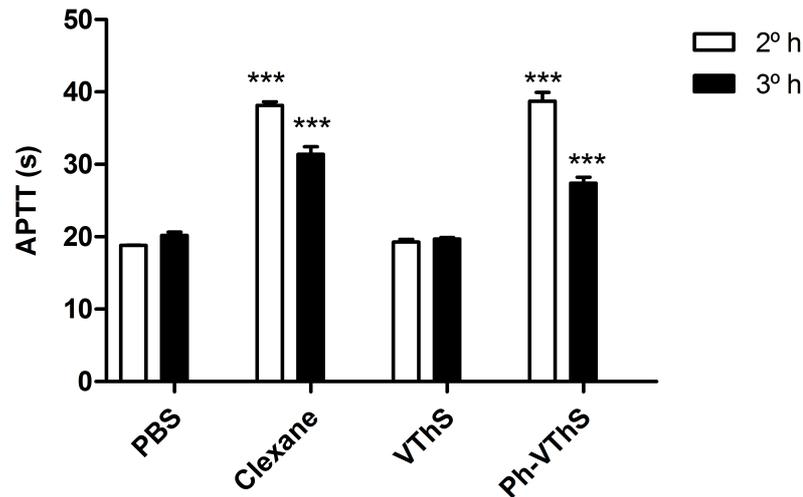


FIGURA 19 - EFEITO NA COAGULAÇÃO DO PLASMA DE RATOS, 2 E 3 HORAS APÓS INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DOS POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS

NOTA: Os resultados foram expressos como aPTT \pm EMP (n = 3) $p < 0.001^{***}$ quando comparados, por Tukey, com o grupo controle negativo (PBS) do mesmo tempo de coleta. Clexane - 300 UI/kg, VThS e Ph-VThS - 500 UI/kg (n=3)

Pode-se perceber que as atividades de Ph-VThS e do clexane diminuíram na terceira hora após a administração, em relação à segunda hora, o que sugere que eles foram gradativamente biodegradados e/ou excretados. Nogueira (2013) também observou que heparinas suína e bovina de baixa massa molecular apresentaram redução no aPTT na terceira hora após a administração, em relação à segunda hora.

Os resultados demonstram que Ph-VThS ($M_w = 58.250$ g/mol) tem potencial para ser utilizado como um agente anticoagulante e antitrombótico que pode ser administrado subcutaneamente, assim como as heparinas de baixa massa molecular. Por outro lado, VThS ($M_w = 92.500$ g/mol) mostra atividade apenas se administrado por via endovenosa, semelhante às heparinas não-fractionadas.

7 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados, pode-se concluir que:

- O processo de hidrólise ácida parcial do polissacarídeo nativo (VTh) com $M_W = 92.500$ g/mol, da goma de exsudato de *V. thyrsoidea*, produz uma glucuronomanana (Ph-VTh) com $M_W = 58.250$ g/mol;
- A sulfatação química de VTh e Ph-VTh gerou as frações VThS e Ph-VThS com DS de 0,20 e 0,24, respectivamente;
- Os espectros de RMN (HSQC-editado) dos polissacarídeos antes e após a sulfatação foram muito similares, provavelmente, devido ao baixo DS dos polissacarídeos quimicamente sulfatados.
- A partir da análise de metilação é possível indicar que a sulfatação ocorreu, preferencialmente, na posição O-5 das unidades de arabinose de VThS, e na posição O-6 das unidades de manose de Ph-VThS;
- Na avaliação da atividade anticoagulante *in vitro*, por aPTT, VTh e Ph-VTh não mostraram efeito sobre a coagulação do plasma, enquanto que os polissacarídeos sulfatados, VThS e Ph-VThS, apresentam atividade anticoagulante de 8,59 e 2,67 UI/mg, respectivamente;
- Assim como ocorre para a heparina, o efeito anticoagulante dos polissacarídeos quimicamente sulfatados pode ser controlado com protamina;
- Como a heparina, os polissacarídeos quimicamente sulfatados apresentaram um mecanismo anticoagulante do tipo serpino-dependente, sendo capazes de inibir a α -trombina na presença de AT e HCII, e o fator Xa na presença de AT;
- Na presença de HCII, VThS apresentou melhor desempenho que a heparina em inibir a α -trombina;
- VThS e Ph-VThS apresentaram efeito antitrombótico *in vivo* igual, estatisticamente, à heparina em todas as concentrações testadas, conseguindo reduzir a trombose em aproximadamente 50% na concentração de 40 UI/kg;
- Assim como as heparinas de baixa massa molecular, Ph-VThS é absorvido quando administrado por via subcutânea.

- Os resultados sugerem que VThS e Ph-VThS são promissores agentes anticoagulantes e antitrombóticos.

REFERÊNCIAS

AINLE, F. N.; PRESTON, R. J. S.; JENKINS, V. P.; NEL, H. J.; JOHNSON, J. A.; SMITH, O. P.; WHITE, B.; FALLON, P. G.; O'DONNELL, J. S. Protamine sulfate down-regulates thrombin generation by inhibiting factor V activation. **Blood**, v. 114, n. 8, 1658-1665, 2009.

ALBAN, S.; SCHAUERTE, A.; FRANZ, G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 267-276, 2002.

ARAÚJO, C. A., NOSEDA, M. D., CIPRIANI, T. R., GONÇALVES, A. G., DUARTE, M. E., DUCATTI, D. R.B. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 483-491, 2013.

BERRY, C. N.; GIRARD, D.; LOCHOT, S.; LECOFFRE, C. Antithrombotic actions of argatroban in rat models of venous, mixed and arterial thrombosis, and its effects on the tail transection bleeding time. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, p. 1209-1214, 1994.

BOURIN, M. C.; LINDAHL, U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. **Biochemical Journal**, v. 289, p. 313-330, 1993.

BOZZINI, C.E.; MOLINAS, F. Hemostasia. In: HOUSSAY A.B.; CIRGOLANI, H. E. **Fisiologia Humana de Housay**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

CAPILA, I.; LINHARDT, R.J. Heparin-protein interactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, p. 390-412, 2002.

CARLOS, M. M. L.; FREITAS, P. F. S. Study of blood coagulation cascade and the reference values. **Acta Veterinária Brasílica**, v. 1, n. 2, p. 49-55, 2007.

CASU, B. Structure and active domains of heparin. In: GARG, H. G.; LINHARDT, R. J.; HALES C. A. **Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate**, Elsevier, 2005, p. 1-28.

CASU, B. Structure and biological activity of heparin. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 43, p. 51-134, 1985.

CATERINA, R. D.; HUSTED, S.; WALLENTIN, L.; ANDREOTTI, F.; ARNESEN, H.; BACHMANN, F.; BAIGENT, C.; HUBER, K.; JESPERSEN, J.; KRISTENSEN, S. D.; LIP, G. Y. H.; MORAIS, J.; RASMUSSEN, L. H.; SIEGBAHN, A.; VERHEUGT, F. W. A.; WEITZ, J. I. General mechanisms of coagulation and targets of anticoagulation (Section I): Position paper of the ESC working group on thrombosis - task force on anticoagulants in heart disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 109, p. 569-579, 2013.

CAUGHEY, G. H. Building a better heparin. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 129-132, 2003.

CHEN, S.; LI, G.; WU, N.; GUO, X.; LIAO, N.; YE, X.; LIU, D.; XUE, C.; CHAI, W. Sulfation pattern of the fucose branch is important for the anticoagulant and antithrombotic activities of fucosylated chondroitin sulfates. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3054-3066, 2013.

CHEN, Z.; SEIFFERT, D.; HAWES, B. Inhibition of Factor XI activity as a promising antithrombotic strategy. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 9, p. 1435-1439, 2014.

CHEVOLOT, L.; FOUCAULT, A.; CHAUBET, F.; KERVAREC, N.; SINQUIN, C.; FISHER, A. M.; BOISSON-VIDAL, C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationship with anticoagulant activity. **Carbohydrate Research**, v. 319, p. 154-165, 1999.

CLÉ, D. V.; GARCIA, A. A.; BRUNETTA, D. M.; SCHWARTZMANN, P. V.; MORIGUTI, J. C. Anticoagulação em pacientes hospitalizados. **Revista de Medicina de Ribeirão Preto**, v. 43, n. 2, p. 107-117, 2010.

CIPRIANI, T. R.; GRACHER, A. H. P.; SOUZA, L. M.; FONSECA, R. J. C.; BELMIRO, C. L. R.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. **Thrombosis Haemostasis**, v. 101, p. 860-896, 2009.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.

COLMAN, R. W. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? **The Journal Experimental of Medicine**, v. 203, n.3, p. 493-495, 2006.

COMMON PATHWAY OF COAGULATION. Disponível em:
<<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/pathway>>. Acesso em: 05/02/2015.

CURRY, A. N. G.; PIERCE, J. M. T. Conventional and near-patient tests of coagulation. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 7, n. 2, p. 45-50, 2007.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, p. 1310-1312, 1964.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, n. 1, p. 106-110, 1962.

DORE, C. M. P. G.; ALVES, M. G. C. F.; WILL, L. S. E. P.; COSTA, T. G.; SABRY D. A.; RÉGO, L. A. R. S.; ACCARDO, C. M.; ROCHA, H. A. O.; FIGUEIRA, L. G. A.; LEITE, E. L. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 467-475, 2013.

EDELBERG, J. M., CHRISTIE, P.D., ROSENBERG, R.D. Regulation of vascular bed-specific prothrombotic potential. **Circulation Research**, v. 89, p. 117-124, 2001.

EYRE, L.; GAMLIN, F. Haemostasis, blood platelets and coagulation. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 11, n. 6, p. 244-246, 2010.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical of Biochemistry**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 34, p. 229-237, 2001.

GRACHER, A. H. P. **Avaliação do potencial anticoagulante e antitrombótico de polissacarídeos nativos e quimicamente sulfatados de basidiomicetos**. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GRACHER, A. H. P.; CIPRIANI, T. R.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Antithrombin and heparin cofactor II-mediated inactivation of α -thrombin by a synthetic, sulfated mannogalactan. **Thrombosis Research**, v. 126, p. 180-187, 2010.

GUYTON, A. C.; HALL J.E. Tratado de Fisiologia Médica. In: _____. **Hemostasia e Coagulação Sanguínea**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. P. 457-468.

HAINES, A. H. Relative reactivities of hidroxyl groups in carbohydrates. **Advances in Carbohydrates Chemistry**, v. 33, p. 11-110, 1976.

HANSON, S. R.; SAKARIASSEN, K. S. Blood flow and antithrombotic drug effects. **American Heart Journal**, v. 135, p. S132-S145, 1998.

HEIT, J. A. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, v. 28. p. 370-377, 2008.

HINSBERGH, V. W. M. The endothelium: vascular control of haemostasis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 95, p. 198-201, 2001.

HIRSH, J.; ANAND, S.S.; HALPERIN, J.L.; FUSTER, V. Guide to anticoagulant therapy, Heparin: a statement for healthcare professional from the American Heart Association. **Circulation**, v. 103, p. 2994-3018, 2001.

HIRSH, J.; FUSTER, V.; ANSELL, J.; HALPERIN, J.L. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy, **Circulation**, v. 107, p. 1692-1711, 2003.

IBRAM – Instituto Brasília Ambiental. Disponível em: <<http://www.ibram.df.gov.br/noticias/item/2089-árvores-do-cerrado.html>>. Acesso em: 08/02/2015.

JAY, R. M.; LIU, P. L. How anticoagulants work. **Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management**, v. 30, p. 30-39, 2006.

JIANG, C.; XIONG, Q.; LI, S.; ZHAO, X.; ZENG, X. Structural characterization, sulfation and antitumor activity of a polysaccharide fraction from *Cyclina sinensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 200-206, 2015.

JINDAL, M.; RANA, V.; KUMAR, V.; SINGH, R. S.; KENNEDY, J. F.; TIWARY, A. K. Sulfation of *Aegle marmelos* gum: Synthesis, physico-chemical and functional characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1660-1668, 2013.

JOHANSSON, L.; TUOMAINEN, P.; YLINEN, M.; EKHOLM, P.; VIRKKI, L. Structural analysis of water-soluble and -insoluble β -glucans of whole-grain oats and barley. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 267-274, 2004.

KAMIDE, K.; OKAJIMA, K.; TOSHIHIRO, M.; OHNISHI, M.; KOBAYASHI, H. Roles of Molecular Characteristics in Blood Anticoagulant Activity and Acute Toxicity of Sodium Cellulose Sulfate. **Polymer Journal**, v. 15, p. 309-321, 1983.

KU, S.K.; BAE, J.S. Antithrombotic activities of wogonin and wogonoside via inhibiting platelet aggregation. **Fitoterapia**, v. 98, p. 27-35, 2014.

LIANG, W.; MAO, X.; PENG, X.; TANG, S. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharide anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 776-785, 2014.

LINDAHL, U.; BÄCKSTRÖM, G.; HÖÖK, M.; THUNBERG, L.; FRANSSON, L. A.; LINKER, A. Structure of the antithrombin-binding site in heparin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 7, p. 3198-3202, 1979.

LIU, H.; ZHANG, Z.; LINHARDT, R. Lessons learned from the contamination of heparin. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 313-321, 2009.

LIU, Y.; LIU, C.; TAN, H.; ZHAO, T.; CAO, J.; WANG, F. Sulfation of polysaccharide obtained from *Phellinus ribis* and potential biological activities of the sulfated derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 370-375, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. São Paulo: Plantarum, 2002. v. 2, p. 367.

LOZANO, F. Actualización en trombosis venosa profunda que afecta a las extremidades inferiores: diagnóstico. **Angiología**, v. 55, p. 476-87, 2003.

LU, X.; MO, X.; GUO, H.; ZHANG, Y. Sulfation modification and anticoagulant activity of the polysaccharides obtained from persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1189-1195, 2012.

MAAS, N. C.; GRACHER, A. H. P.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: Influence on anticoagulant and antithrombotic effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1081-1087, 2012.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, p. 498-499, 1964.

MACKMAN, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature**, v. 451, p. 914-918, 2008.

MAJERUS, P. W.; TOLLEFSEN, D. M. Coagulação sanguínea e anticoagulants, trombolíticos e fármacos antiplaquetários. In: GOODMAN; GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 1321-1341.

MARTINICHEN, J. C. **Propriedades anticoagulantes e antitrombóticas de polissacarídeos quimicamente sulfatados**. 18 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2005.

MARTINICHEN-HERRERO, J. C.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activity of sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirense* Hale. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 7-13, 2005.

MELO, R. E. V. A.; SILVA, C. O.; SILVA, L. O.; MELO, M. M. V. A.; LINS, E. M. Trombose Venosa Profunda. **International Journal of Dentistry**, v. 1, n. 2, p. 73-79, 2006.

MELLO, N.A.; DUQUE, F.L.V. Trombogênese e Trombofilia. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 2, p. 105-118, 2003

MESTECKINA, N. M.; EGOROV, A.V.; SHCERBUKHIN, V. D. Synthesis of Galactomannan Sulfates. **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya**, v. 42, n. 3, p. 368-373, 2006.

MESTECKINA, N. M.; SHCERBUKHIN, V. D. Sulfated Polysaccharides and their Anticoagulant Activity: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 267-273, 2010.

MIHAI, D.; MOCANU, G.; CARPOV, A. Chemical reactions on polysaccharides. I. Pullulan sulfation. **European Polymer Journal**. v. 37, p. 541-546, 2001.

MINE, S.; YAMAZAKI, T.; MIYATA, T.; HARA, S.; KATO, H. Structural mechanism for heparin-binding of the third kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor. **Biochemistry**, v. 42, p. 78-85, 2002.

MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 225-232, 1999.

MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. S.; GRAY, E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **Journal Biotechnology**, v. 77, p. 123- 135, 2000.

NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **Biochemical Journal**, v. 86, p. 1323-1329, 1979.

NAGUMO, T.; NISHINO, T. Fucan sulfates and their anticoagulant activities. In: DUMITRIU, S. **Polysaccharides in Medicinal Applications**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 545-574.

NOGUEIRA, A. V. **Comparação das atividades anticoagulante e antitrombótica de heparinas bovina e suína de diferentes massas moleculares**. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências –Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

NOTI, C.; SEEBERGER, P.H. Chemical approaches to define the structure-activity relationship of heparin-like glycosaminoglycans. **Chemistry & Biology**, v.12, p. 731-756, 2005.

O'NEILL, A. N. Sulphated derivatives of laminaran. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 33, p. 1097-1101, 1955.

PAZUR, J. H. Neutral polysaccharides. In: CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. **Carbohydrate Analysis: A Practical Approach**. New York: Oxford University Press, 1994. p. 73-124.

PERRINAUD, A.; JACOBI, D.; MACHET, M. C.; GRODET, C.; GRUEL, Y.; MACHET, L. Bullous hemorrhagic dermatosis occurring at sites distant from subcutaneous injections of heparin: Three cases. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 2, p. 5-7, 2006.

PETITOU, M.; CASU, B.; LINDAHL, U. 1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. **Biochimie**, v. 85, p. 83-89, 2003.

POMIN, V. H. An overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. **Biopolymers**, v. 91, p. 601-609, 2009.

RAND, M. L.; MURRAY, R. K. Hemostasia e Trombose. In: MURRAY, R. K.; GRANNEER, D. K.; RODWELL, V. W. **Bioquímica Ilustrada**. São Paulo: McGraw-Hill, 2007. p. 559-567.

REYERS, I.; MUSSONI, L.; DONATI, M. B.; GAETANO, G. Venous thrombosis induced by ligation of inferior vena cava. **Thrombosis Research**, v.18, p. 669-674, 1980.

RODRIGUES, J. A. G.; ARAÚJO, I. W. F.; PAULA, G. A.; BESSA, E. F.; LIMA, T. B.; BEVENIDES, N. M. B. Isolamento, fracionamento e atividade anticoagulante de *iota*-carragenana da *Solieria filiformis*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2310-2316, 2010.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SANDFORD, P.A.; BAIRD, J. Industrial utilisation of polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983. p. 412-485.

SCHOEN, P.; WIELDERS, S.; PETITOU, M.; LINDHOUT, T. The effect of sulfation on the anticoagulant and antithrombin III-binding properties of a heparin fraction with low affinity for antithrombin III. **Trombosis Research**, v. 57, p. 415-423, 1990.

SMITH, J. W.; DAY, T. K.; MACKIN, A. Diagnosing bleeding disorders. **Compendium**, v. 2, p. 828-843. 2005.

TAKANO, R.; NAGAI, T.; WU, X.; XU, X. Y.; HUY, N.T.; KAMEI, K.; HARA, S. Sulfation of polysaccharides using monomethyl sulfate. **Journal Carbohydrate Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 1185-1190, 2000.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383-1388, 1972.

TOLLEFSEN, D. M. Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury, **Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p. 454-460, 2007.

VASCONCELOS, A. F. D. **β -glucanas de isolados fúngicos do gênero *botryosphaeria*: produção, caracterização química e atividade anticoagulante.** 122 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Campus Rio Claro, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2009.

VEIGA, A. G. M.; SANTOS, I. A. T.; PASSERI, C. R.; PAPINI, S. J. Venous thromboembolism. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 70, n. 10, p. 335-341, 2013.

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

VISKOV, C.; ELLI, E.; URSO, E.; GAUDESÍ, D.; MOURIER, P. HERMAN, F.; BOUDIER, C.; CASU, B.; TORRI, G.; GUERRINI, M. Heparin dodecasaccharide containing two antithrombin-binding pentasaccharides: Structural features and biological properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 36, p. 25895-25907, 2013.

VOGEL, G. M. T.; MEULEMAN, D. G.; BOURGONDIËN, F. G. M.; HOBBELEN, P. M. J. Comparison of two experimental thrombosis models in rats: effects of four glycosaminoglycans. **Thrombosis Research**, v. 54, p. 399-410, 1989.

VOGLER, E. A.; SIEDLECKI, C. A. Contact activation of blood-plasma coagulation. **Biomaterials**, v. 30, p. 1857-1869, 2009.

ZHANG, F.; YANG, B.; LY, M. SOLAKYILDIRIM, K.; XIAO, Z.; WANG, Z.; BEAUDET, J. M.; TORELLI, A. Y.; DORDICK, J. S.; LINHARDT, R. J. Structural characterization of heparins from different commercial sources. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 2793-2803, 2011.

WAGNER, R., **Determinação da estrutura química do polissacarídeo das gomas de exsudatos de *Vochysia tucanorum* e *Vochysia thyrsoidea*.** 89 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2007.

WAGNER, R.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; DELGOBO, C. L.; PIMENTEL, N. M.; GORIN, P. A. J. Structure of a glycolglucuronomannan from the low-viscosity gum of *Vochysia lehmannii*. **Carbohydrate Polymers**, v 57, p. 268-275, 2004.

WAGNER, R.; SIMAS, F. F., PEREIRA, G. C. Z.; ANGELI, A.; BRITO, J. O.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; DELGOBO, C. L.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Structure of a glycolglucuronomannan from the gum exudate of *Vochysia tucanorum*. **Carbohydrate Polymers**, v 69, p. 512-521, 2007.

WAGNER, R.; SIMAS, F. F.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; SILVA, M. A.; GORIN, P. A. J. A high-viscosity glycolglucuronomannan from the gum exudate of *Vochysia thyrsoidea*: Comparison with those of other *Vochysia* spp. **Carbohydrate Polymers**, v 72, p. 382-389, 2008.

WANG, L.; LI, X.; CHEN, Z. Sulfated modification of the Polysaccharides obtained from defatted rice bran and their antitumor activities. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 44, p. 211–214, 2009.

WANG, X.; ZHANG, Z.; YAO, Z.; ZHAO, M.; QI, H. Sulfation, anticoagulant and antioxidant activities of polysaccharide from green algae *Enteromorpha linza*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 225-230, 2013.

WANG, Y. SHAO; J. YAO, S.; ZHANG, S.; YAN, J.; WANG, H.; CHEN, Y. Study on the antithrombotic activity of *Umbilicaria esculenta* polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 231-236, 2014.

WARDROP, D.; KEELING, D. The story of the discovery of heparin and warfarin. **British Journal of Haematology**, v. 141, p. 757-763, 2008.

WHISTLER, R. L.; SPENCER, W. W. Sulfation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 4, p. 297-298, 1964.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963 (a).

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-67, 1963 (b).

WU, S. J.; CHUN, M. W.; SHIN, K. H.; TOIDA, T.; PARK, Y.; LINHARDT, R. J.; KIM,

Y. S. Chemical sulfonation and anticoagulant activity of acharan sulfate. **Thrombosis Research**, v. 92, p. 273-281, 1998.

YANG, J.; DU, Y.; HUANG, R.; WAN, H.; WEN, Y. The structure-anticoagulant activity relationships of sulfated lacquer polysaccharide: Effect of carboxyl group and position sulfation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 9-15, 2005.

YANG, J.; DU, Y.; WEN, Y.; LI, T.; HU, L. Sulfation of Chinese lacquer polysaccharides in different solvents. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 397-403, 2003.

YOON, S. J.; PYUN, Y. R.; HWANG, J. K.; MOURÃO, P. A. S. A sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* has mainly heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 2326-2330, 2007.

YOSHIDA, T.; NAKASHIMA, H.; YAMAMOTO, N.; URYU, T. Anti-AIDS virus activity in vitro of dextran sulfates obtained by sulfation of synthetic and natural dextrans. **Polymer Journal**, v. 25, 1069-1077, 1993.

YUFENG, W.; SHAO, J.; YAO, S.; ZHANG, S.; YAN, J.; WANG, H.; CHEN, Y. Study on the antithrombotic activity of *Umbilicaria sculentia* polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 231-236, 2014.

ANEXO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 767

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

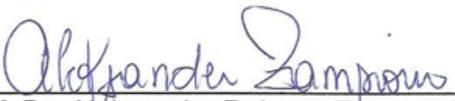
PROCESSO: 23075.052260/2013-15

APROVADO: 20/03/2014 – R.O. 02/2014

TÍTULO: Sulfatação química do polissacarídeo da goma de exsudato de *Vochysia thyrsoidea* e avaliação das atividades anticoagulantes e antitrombótica

AUTORES: Thales Ricardo Cipriani, Helyn Priscila de Oliveira Barddal

DEPARTAMENTO: Bioquímica


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA