

LILIANE PIRES

ANÁLOGOS FUNCIONAIS DA HEPARINA

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA
1998

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski

**O fardo parece menos pesado quando se olha para o
alto, do que quando se curva a frente para o chão.**

**Aos meus pais, Celso e Lilian Pires,
pelo amor e carinho que serviram de
apoio para que eu pudesse realizar
meus sonhos.**

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de vida.

À professora Dra Maria Rita Sierakowski pela orientação, amizade, dedicação, apoio, incentivo e exemplo de persistência, força e humanidade;

Aos meus pais Celso e Lilian pelo amor, carinho e incentivo para que eu jamais desistisse dos meus ideais;

Ao meu noivo, Alexandre Gomes Gonçalves, pela paciência, compreensão, amor, respeito e amizade durante os últimos seis anos;

Às minhas irmãs Ana Paula, Bianca, Caroline pelo carinho e amizade;

Aos meus avós Edmund Erhardt Föerster, Clotilde Leone Föerster, Ismael Alves Pires e Ignês Ruiz Pires pelo exemplo e carinho;

Aos amigos Darlene Camatti e Leonardo pela compreensão, apoio, amizade, colaboração e incentivo incondicionais;

Ao amigo Dr. Joaquim de Almeida Prado pelo incentivo constante para o meu aprimoramento, além do exemplo de humildade, persistência e caridade;

Ao amigo Sandro C. Pinto pelo carinho e amizade;

Aos meus sogros Antonio e Aidê Gonçalves pelo auxílio material e espiritual necessários nesta caminhada;

À Carolina Gomes Gonçalves pela amizade, carinho e incentivo ao crescimento intelectual e espiritual;

Aos companheiros de laboratório Lucy Ono, Rilton Alves de Freitas, Marli Miriam S. Lima, Joaine Amaral, Sandra Martin e Andréa Menegola;

Aos amigos e companheiros de turma Rose Adele, Josiane, Luciana e Siumara pela amizade e carinho;

Aos amigos César pelas análises de GC-MS e RMN-¹³C, além da amizade e apoio durante os dois últimos anos, Guilherme pela amizade e auxílio com a metanólise e Renato pela amizade e por todas as vezes que me fez rir;

Aos professores Dra. Fany Reicher e Dra Joana Léa Ganter pelo apoio e incentivo;

À Dra Glaci T. Zancan , chefe do Departamento, por sua luta para tivéssemos a melhor formação possível;

À Dra. Selma Faria Zawadzi Baggio e Dr. Marcello Iacomini pelo apoio, sugestões e correção da tese;

À professora Dra Maria Benigna M. de Oliveira, coordenadora do Curso de Pós-graduação, pelo estímulo e compreensão;

Ao amigo e professor Dr. Moacir Kaminski pelo apoio, incentivo e exemplo de humanidade;

Ao professor Yedo Alquini pelo apoio e atenção;

Ao Ângelo Roberto dos Santos de Oliveira pela paciência e análises de infravermelho;

Ao Sr. Aldir Gottardi e laboratório de Análises Clínicas do Hospital Pequeno Príncipe - Curitiba por permitir a realização dos ensaios de atividade anticoagulante;

Ao CNPq pelo suporte financeiro;

À todos os professores, colegas de curso e de trabalho, funcionários e amigos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
INTRODUÇÃO	1
1. GALACTOMANANAS – ASPECTOS GERAIS	2
2. PROPRIEDADES E APLICAÇÕES	6
3. COAGULAÇÃO SANGUÍNEA E POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....	7
OBJETIVOS	24
MATERIAIS E MÉTODOS	25
1. OBTENÇÃO DAS SEMENTES E DOS POLISSACARÍDEOS	25
2. PURIFICAÇÃO DA AMOSTRA OBTIDA POR EXTRAÇÃO AQUOSA DO ENDOSPERMA DE SEMENTES DE <i>Senna macranthera</i>	25
2.1. Pré-purificação por centrifugação	25
2.2. Purificação por passagem em coluna de troca iônica (DEAE-celulose forma Cl ⁻)	26
3. ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS	26
3.1. Quantificação de carboidratos e proteínas	26
3.2. Determinação da composição monossacarídica	27
3.2.1. Hidrólise ácida dos polissacarídeos do endosperma de sementes de <i>Senna macranthera</i>	27
3.2.2. Redução e acetilação dos produtos resultantes do processo de hidrólise	27

3.3. Obtenção dos <i>O</i> -metil-aldeídos acetato.....	28
3.4. Oxidação com metaperiodato de sódio	29
3.5. Determinação da rotação óptica específica	29
3.6. Determinação da massa molar aparente	30
4. ANÁLISES POR MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	30
4.1. Espectroscopia de infra-vermelho (IV)	30
4.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN- ¹³ C). ..	30
5. SULFATAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	31
6. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (DS)	32
7. ANÁLISE DAS PROPRIEDADES ANTICOAGULANTES.....	32
7.1. Tempo parcial de tromboplastina ativada (APTT)	32
7.2. Determinação da afinidade por AT III	33
7.3. Atividade do fator Xa	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
1. EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO OBTIDO DAS SEMENTES DE <i>Senna macranthera</i>	34
2. ANÁLISE ESTRUTURAL DA GALACTOMANANA PURIFICADA (FA) ..	38
2.1. Análise dos <i>O</i> -metil-aldeídos acetato	38
2.2. Oxidação com metaperiodato de sódio	39
2.3. Rotação óptica específica	40
2.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do carbono 13	41
3. REAÇÃO DE SULFATAÇÃO	46
4. CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS SULFATADOS	47
4.1. Análise por infra-vermelho	47

4.2. Rotação óptica específica	49
4.3. Determinação do grau de substituição (DS)	49
4.4. Gel permeação	50
4.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear do carbono 13 dos derivados sulfatados	54
5. DETERMINAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTICOAGULANTE <i>in vitro</i>	57
CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS

1. Estrutura geral de galactomananas	3
2. Vista estereoscópica das três voltas de uma galactomanana com eixo de ordem dois, contendo cadeia lateral de galactose em unidades alternadas de manose.....	4
3. Coagulação sanguínea	8
4. Estrutura da sequência pentassacarídica da heparina a qual se liga à AT III....	14
5. Sítio de ligação do pentassacarídeo na AT III humana.....	16
6. <i>Senna macranthera</i>	21
7. Flores de <i>Senna macranthera</i>	22
8. Frutos e sementes de <i>Senna macranthera</i>	22
9. Espectro RMN- ¹³ C da amostra SP obtida do endosperma de sementes de <i>Senna macranthera</i>	41
10. Espectro de RMN- ¹³ C da galactomanana do endosperma de sementes de <i>Senna macranthera</i>	41
11. Região de C-4 ampliada do espectro de RMN- ¹³ C de unidades de manose da galactomanana purificada do endosperma de sementes de <i>Senna</i> <i>macranthera</i>	42
12. Espectro de RMN- ¹³ C do tipo DEPT da galactomanana purificada do endosperma de sementes de <i>Senna macranthera</i>	43
13. Espectro de RMN- ¹ H da galactomanana purificada do endosperma de sementes de <i>Senna macranthera</i>	44
14. Espectro de infra-vermelho da galactomanana parcialmente purificada e do	

seu derivado sulfatado	48
15. Perfil de eluição das galactomananas FA e FAS-0,4	53
16. Espectro de RMN- ¹³ C da amostra SPS-0,17.....	54
17. Espectro de RMN- ¹³ C da amostra SPS-0,54.....	55
18. Espectro de RMN- ¹³ C da amostra FAS-0,4.....	56
19. Atividade anticoagulante medida pelo teste de APTT das amostras nativas e sulfatadas de SP e FA	59
20. Atividade anticoagulante medida pelo teste de APTT dos derivados sulfatados de SP antes e após a filtração por membrana	61
21. Atividade anticoagulante medida pelo teste de APTT do derivado de FA antes e após filtração por membrana	62
22. Espectro de RMN- ¹³ C da amostra SPS-0,54 PM eluída em coluna de agarose AT III com tampão Tris/HCl pH 7,2	67
23. Espectro de RMN- ¹³ C da amostra FAS-0,4 PM eluída em coluna de agarose AT III com tampão Tris/HCl pH 7,2	67
24. Espectro de RMN- ¹³ C da amostra SPS-0,54 PM eluída em coluna de agarose AT III com NaCl 2 Mols/L.....	68

LISTA DE TABELAS

I. Análise dos monossacarídeos presentes nos polissacarídeos do endosperma de sementes de <i>Senna macranthera</i>	35
II. Composição química e rendimento das frações polissacarídicas obtidas do endosperma de sementes de <i>Senna macranthera</i>	36
III. Análise dos alditóis acetatos parcialmente metilados da galactomanana da fração FA	38
IV. Análise da oxidação com metaperiodato de sódio da galactomanana (FA) de sementes de <i>Senna macranthera</i>	39
V. Determinação do grau de substituição (DS) dos derivados sulfatados dos polissacarídeos de <i>Senna macranthera</i>	50
VI. Massa molecular aparente (MMa) das galactomananas nativas e modificadas obtidas do endosperma de sementes de <i>Senna macranthera</i>	52
VI. Concentração (m/v) para a atividade anticoagulante máxima dos derivados sulfatados medida pelo teste APTT.....	60
VIII. Atividades anticoagulante dos derivados sulfatados pós cromatografia em coluna de agarose-AT III	65

LISTA DE ABREVIATURAS

APTT - tempo parcial de tromboplastina ativada.

AT III - antitrombina III.

CG-EM - cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria da massa.

D₂O - óxido de deutério (água deuterada).

DEPT - distortionless enhancement by polarization transfer.

DMSO - dimetilsulfóxido.

DP - grau de polimerização.

DS - grau de substituição.

FA - galactomanana purificada.

FAS - derivado sulfatado de FA.

GAL - galactose.

GPC - cromatografia por gel permeação.

HC II - cofator II da heparina.

IV - infravermelho.

KDa - quilo dalton.

m/v - massa por volume.

MAN - manose.

Mhz - mega hertz.

MMa - massa molecular aparente.

ppm - parte por milhão.

RMN-¹³C - ressonância magnética nuclear do carbono 13.

rpm - rotação por minuto.

SP - Polissacarídeo parcialmente purificado do endosperma de sementes de *Senna macranthera*.

SPS - derivado sulfatado de SP.

TFA - ácido trifluoracético.

TT – tempo de trombina.

UI – unidades internacionais.

v/v – volume por volume.

RESUMO

A mistura polissacarídica obtida por extração aquosa do endosperma de sementes de *Senna macranthera* foi purificada por centrifugação, originando a amostra SP, e por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) dando origem a uma galactomanana - FA, com razão molar manose : galactose aproximada de 3 : 1. Essa é constituída de uma cadeia principal de unidades β -D-manopiranosídicas ligadas (1 \rightarrow 4) com algumas unidades substituídas em O-6 por α -D-galactopirranose e outras unidades podem estar substituídas nesta posição por α -D-manopirranose e essas substituídas em O-6 por α -D-galactopirranose.

Após a reação de sulfatação, os derivados de SP e FA foram caracterizados por métodos químicos e físico-químicos. O grau de substituição (DS) foi determinado como sendo 0,17 e 0,54 para sulfatações sequenciais da galactomanana SP e 0,4 para FA. Analisando seus espectros de RMN - C^{13} , percebeu-se que a substituição por sulfato deu-se preferencialmente no O-6 das unidades de α -D-galactopirranose e β -D-manopirranose. Os valores de massa molecular aparente, determinados pela técnica de gel permeação foram de 1,2 e 2,4 MDa para SP e FA, respectivamente; e 1,9; 1,7 e 2,4 MDa para os derivados SPS-0,17; SPS-0,54 e FAS-0,4, respectivamente.

Estudos de propriedade anticoagulante, usando plasma normal humano liofilizado para as análises antes e após a cromatografia de afinidade utilizando-se matriz de agarose-AT III, foram realizados através dos testes de APTT e Heptest. Os resultados obtidos foram relacionados com a heparina padrão (183 UI/mg, D.S. 0,6).

Concentrações de SPS-0,17; SPS-0,54 e FAS-0,4, respectivamente com valores de 31; 8 e 20 μ g / mL de plasma foram necessárias para se atingir a mesma atividade que a heparina com 1 μ g ou 4,57 UI / mL de plasma. Estes derivados foram filtrados em membranas de poros 3 e 1,2 μ m, obtendo-se aumento de atividade de 33 e 13 % para SPS-0,17 e SPS-0,54, respectivamente; enquanto o derivado FAS-0,4, após filtração, não apresentou aumento significativo em sua atividade.

Amostras de SPS-0,54 e FAS-0,4 após filtração em membrana foram eluídas em coluna de agarose-ATIII com tampão tris/HCl pH 7,2 e NaCl sequencialmente. Toda a atividade anticoagulante obtida para o material não eluído estava presente na fração aderida à coluna podendo-se sugerir que a atividade anticoagulante desta fração é devido à interação com a AT III.

As amostras sulfatadas que ficaram aderidas à matriz de AT III foram submetidas ao Heptest e os resultados obtidos mostraram que os derivados sulfatados aceleraram a taxa de inibição do fator Xa pela antiprotease, confirmando a interação específica do polieletrólito com a AT III. Pode-se, assim, concluir que a galactomanana obtida a partir do endosperma de *Senna macranthera*, quando sulfatada, adquire atividade anticoagulante, podendo ser chamada de um heparinóide, principalmente por interagir de maneira específica com a AT III.

INTRODUÇÃO

1. GALACTOMANANAS - ASPECTOS GERAIS

Os polissacarídeos constituem uma das mais abundantes e diversas famílias de biopolímeros, cuja estrutura primária varia na composição, sequência, massa molecular, configuração anomérica, posição da ligação e densidade de carga. São macromoléculas encontradas em grandes quantidades nos organismos vivos, estando envolvidos em funções de proteção, suporte, rigidez e elasticidade dos tecidos animais e vegetais. Sua diversidade estrutural é refletida na grande variedade de propriedades, que têm sido usadas para muitas aplicações (MATHEWS, 1975; CURLING, 1970).

Dentre tais macromoléculas destacam-se as galactomananas, as quais são geralmente compostas de um esqueleto β -1,4-D-manana que é total ou parcialmente substituída nos grupos hidroximetil (6-OH) por unidades α -D-galactopiranosil (DEA, 1975), fig.1. A percentagem de substituição varia com a fonte botânica, parecendo ser constante para as espécies e variando de 30% em *Cassia* spp. à quase 100% em *Tricofolieae* spp.. A presença de ligações α -D-galactosídicas confere rotação óptica positiva e estimativas de DP (grau de polimerização), por métodos físico-químicos, têm sido geralmente em torno de 1000 a 10 000 (DEA & MORRISON, 1975; DEY, 1978).

A distribuição das galactomananas no reino vegetal é limitada, sendo as fontes mais ricas os membros da família Mimosaceae. Também têm sido encontradas em espécies de Annonaceae; Convolvulaceae e Arecaceae (KOOIMAN, 1971) entre outras.

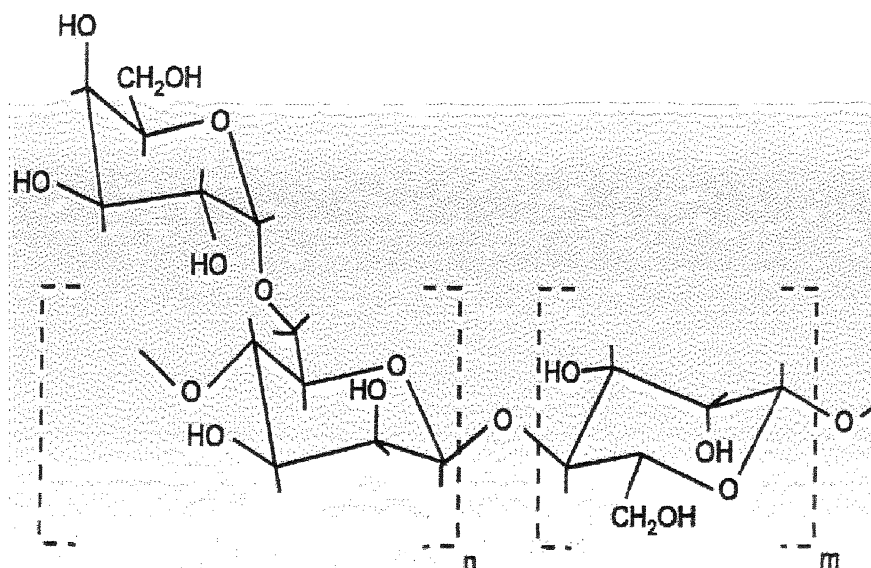


Fig. 1 - Estrutura geral de galactomananas.

A análise por difração de raio X das fibras de algumas galactomananas lembra o observado para mananas, implicando em simetria de eixo de ordem dois e um passo de 10,3 Å. Por causa das três rotações livres da ligação (1→6), as cadeias laterais são mais flexíveis. Como exemplo, uma geometria típica regular de uma hélice de galactomanana, com esqueleto de manose e $\angle(C-4-C-5-C-6-O-6) = 60^\circ$ e cadeias laterais em unidades de manose alternadas adotando a mesma conformação, é mostrada na fig. 2 (CHANDRASEKARAN, 1997).

Para os outros domínios, as orientações relativas das cadeia laterais são significativamente alteradas, mas as suas energias são similares. No entanto, as cadeias laterais poderiam não adotar preferencialmente a mesma conformação nas unidades vizinhas da mesma fibra. Atualmente, os detalhes exatos da estrutura molecular e o empacotamento subsequente na unidade celular ortorrômbica, compatíveis com o observado por raio X, não foram publicados (CHANDRASEKARAN, 1997).

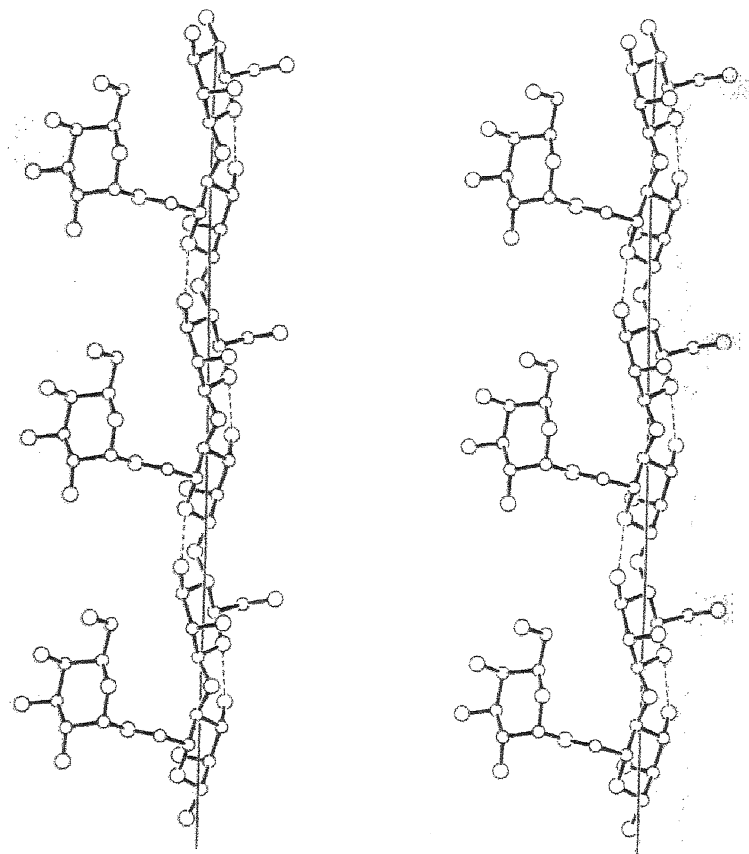


Fig. 2 - Vista estereoscópica das três voltas de uma galactomanana com eixo de ordem dois, contendo cadeia lateral de galactose em unidades alternadas de manose. Nesta conformação, as cadeias laterais são voltadas em direção ao terminal não redutor, e o esqueleto é estabilizado por pontes de hidrogênio intracadeia. A hélice axial está representada por uma linha vertical (CHANDRASEKARAN, 1997).

Esse modelo de biopolímero representa um grupo de mucilagens ou gomas que tem como função primária o fornecimento de carboidratos para o desenvolvimento do embrião durante a germinação ou das gemas durante a brotação, além de possuírem um importante papel fisiológico protegendo as sementes contra flutuações no balanço hídrico e assim evitando a desidratação (DEA & MORRISON, 1975). Podem ser extraídas, em geral, do endosperma de sementes de plantas (DEA & MORRISON, 1975; DEY, 1978) em quantidade variável de 0,1 a 35 % da massa seca das sementes (McCLEARY & NEUKON, 1982).

A manana em si é insolúvel em água sendo a presença da substituição por galactose que confere solubilidade ao polímero. Estudos anteriores demonstraram a necessidade de um nível de substituição de, no mínimo, 10% para se comportarem como polissacarídeos hidrossolúveis (DEA, 1987).

Com relação à sua utilização, as galactomananas têm uma longa história de usos, sendo o “carob bean” ou “locust bean” ou alfarrobo (*Ceratonia siliqua*), nativo do sul da Europa e do Oriente do Mediterrâneo, o exemplo mais antigo. É conhecido e utilizado desde quatro séculos antes de Cristo para alimentação humana e bovina. Seu cultivo foi exportado para outras partes do mundo, incluindo Austrália e Estados Unidos e, dois milênios após a sua descoberta, continua sendo utilizada comercialmente. Além desta espécie, destacam-se as galactomananas de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) e tara (*Ceasalpinia spinosa*), sendo a primeira uma espécie da família das *Fabaceae* que cresce particularmente na Índia e no Paquistão, onde possui considerável importância econômica. A última é uma espécie que fornece galactomanana de uso comercial em menor proporção que as outras duas já citadas, cresce no Peru e suas sementes são semelhantes às de alfarrobo. Apesar da galactomanana de tara ser conhecida há longo tempo, a sua produção comercial regular da goma é recente (LAWRENCE, 1976; MATHESON, 1990).

Os laboratórios de Química de Carboidratos Vegetais e de Biopolímeros da UFPR extraíram e determinaram a estrutura de algumas galactomananas de sementes vegetais nativos que apresentaram diferentes relações molares manose:galactose (GANTER *et al.*, 1992; GANTER, *et al.*, 1994; TAVARES, 1994; GOTTARDI, 1994; RECHIA *et al.*, 1995) e, recentemente, estudos de interação destes polissacarídeos com

outros biopolímeros também vêm sendo realizados (BREZOLIN *et al*,1997; BREZOLIN, 1998).

2. PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DAS GALACTOMANANAS

O principal biopolímero vegetal de uso industrial é a galactomanana, em particular as obtidas de fontes onde a substituição por galactose é relativamente baixa, como o alfarrobo.

O grande interesse por estes polissacarídeos tem resultado da alta capacidade interagir com a água, formando soluções viscosas, mesmo em baixas concentrações, e da capacidade de formar géis em associação com outros polissacarídeos, como a agarose, xantana e carragenana.

Em alimentos de baixo teor calórico, são utilizadas em regimes dietéticos e de redução de peso, pois não são hidrolisados pelas enzimas digestivas humanas, não sendo, portanto, digeridas e não são uma fonte calórica biodisponível. Pode ser utilizada na diminuição da hiperglicemia pós-prandial, da concentração de colesterol plasmático e da pressão sanguínea em indivíduos diabéticos e obesos e como antioxidantes de lipídicos em alimentos processados (ROL, 1973).

É utilizada na indústria de panificação; como impermeabilizante para algodão e fios de fibra e como agentes finais de texturização na indústria têxtil (ROL, 1973).

Na indústria de tintas e papel é utilizada para melhoria das características finais de todos os tipos de papel, como espessantes universais de tintas para impressão, aumentando a maciez, a aparência atraente e as cores brilhantes; como aditivos nos

líquidos de brocas; como agente de separação de espuma de potassa, na precipitação de minérios, resíduos e auxiliar de filtração, em mineração (ROL, 1973).

No tratamento de água também pode ser utilizada, pois não é tóxica e é aprovada pelo U.S. Public Health Service, como coagulante. Também são utilizadas como excipiente de comprimidos; como espessante de cremes dentais, loções e cremes; como agentes impermeabilizantes em bastões explosivos; como biopolímeros funcionais de excelente efeito antimicrobiano; além de muitas outras propriedades (ROL, 1973).

Nas últimas décadas, muitos polissacarídeos neutros, incluindo as galactomananas, têm sido sulfatados através de reação semi-síntese a fim de que os poliânions resultantes atuem como potentes agentes biológicos, sendo utilizados, por exemplo, em ensaios de atividade anticoagulante sanguínea.

3. COAGULAÇÃO SANGUÍNEA E POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Os processos inflamatórios ou de injúria vascular resultam na ativação de fatores pró-coagulantes, conhecidos como zimogênios, que existem normalmente na forma inativa no plasma, comportando-se como substratos de enzimas. Uma vez ativados, tais fatores passam a comportar-se também como agentes enzimáticos, os quais vão atuar sobre o fator subsequente da coagulação originando assim uma cascata (fig. 3), que culmina na ativação da trombina (ROSEMBERG, 1987; JACKSON & NEMERSON, 1980).

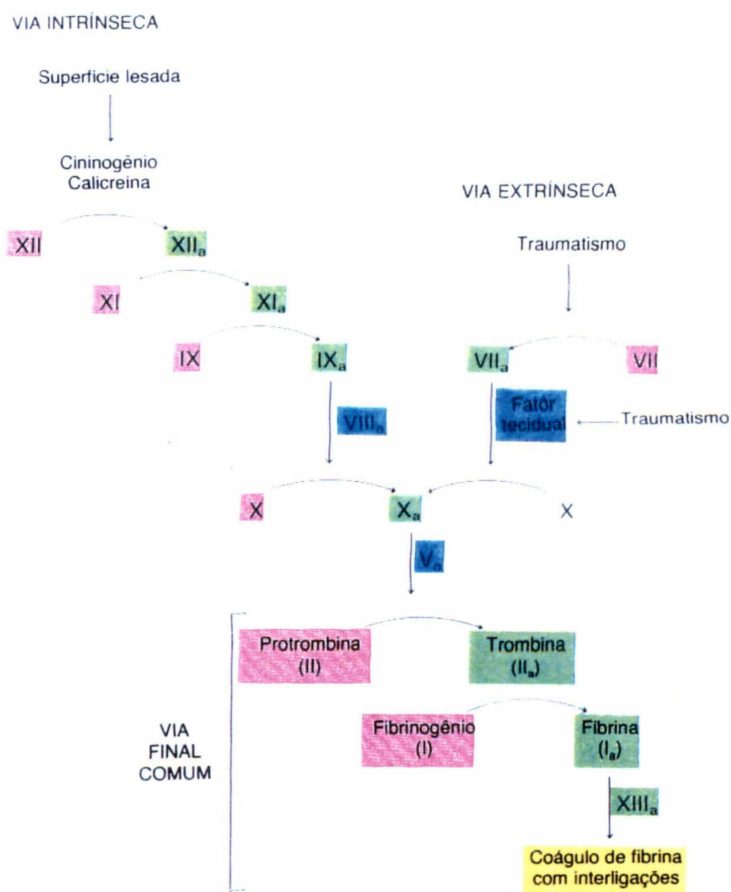


Fig. 3 - **Coagulação Sangüínea** (STRYER, 1992). As formas inativas dos fatores de coagulação estão em cor de rosa, e suas correspondentes formas ativadas em verde. Proteínas estimuladoras que não são enzimas por si só são mostradas em azul.

A função clássica da trombina (fator IIa) neste processo é clivar o fibrinogênio levando à formação do gel de fibrina (MANN *et al.*, 1988; GAILANI & BROZE, 1991), que é o constituinte essencial do coágulo sanguíneo. Entretanto, a trombina também tem funções regulatórias importantes, como ativar os fatores V e VIII, que funcionam como cofatores da coagulação, em um *feedback* positivo que acelera a formação desta enzima e assim aumenta a taxa de formação da fibrina (OLSON & BJÖRK, 1994).

Adicionalmente, a trombina também pode retardar a coagulação em um *feedback* negativo, quando ligada a uma proteína de membrana, trombomodulina, na superfície das células endoteliais. A trombina, assim, ativa a proteína C, a qual, por sua vez, inativa os fatores V e VIII, diminuindo a geração de trombina e, conseqüentemente, também a de fibrina. Uma outra função da trombina é ativar o fator XIII, o qual então estabiliza o coágulo por ligações covalentes cruzadas. Assim, o controle preciso da trombina é de grande importância na hemostasia normal (OLSON & BJÖRK, 1994). Em 1991, GAILANI & BROZE demonstraram a possibilidade da trombina também clivar o fator XI em presença de kininogênio de alta MM e uma superfície negativamente carregada.

A modulação inibitória da atividade da trombina pode se dar por quatro diferentes inibidores de proteinases. Dois deles, inibidor de α_1 -proteinase e α_2 -macroglobulina, são inibidores gerais de proteinases que podem inativar uma série de enzimas. Os outros dois, antitrombina III (AT III) e cofator II da heparina (HC II), são mais específicos para a trombina.

A AT III é uma glicoproteína plasmática de 58 KDa que ocorre presumivelmente em todos os vertebrados. É sintetizada no fígado e apresenta tempo de

meia vida no plasma em torno de três dias (LEON *et al.*, 1983 e COLLEN *et al.* 1977). A concentração normal de AT III no plasma é aproximadamente 0,12 mg/mL, o que corresponde a 2,3 μ M (CONARD *et al.*, 1983).

A AT III pertence ao grupo de inibidores de serina proteases, também chamadas de serpinas, e inibe a trombina em dois passos cineticamente distintos: a formação de um complexo inicial, seguida pela rápida conversão a um complexo estável. A AT III também inativa outras serina proteases da via intrínseca, como os fatores IXa, Xa, XIa e XIIa (OLSON & SHORE, 1982).

O HC II é a outra serpina importante no processo de hemostasia. Está presente no plasma e inibe a trombina e quimotripsina, mas não tem nenhuma atividade contra as outras enzimas da coagulação (PARKER & TOLLEFSEN, 1985; CHURCH *et al.*, 1985).

Os mecanismos de ação da AT III e HC II são profundamente influenciados pela presença de heparina, a qual acelera as taxas de inibição das serinas proteases por estas serpinas (BOURIN & LINDAHL, 1993).

A heparina é uma glicosaminoglicana (ou mucopolissacarídeo) biossintetizada e estocada em mastócitos e basófilos como uma proteoglicana (HORNER & YOUNG, 1982). Foi isolada por Mac Lean, em 1916, de fígado e coração bovinos e, mais recentemente, a heparina comercial é isolada principalmente de intestino de porco ou de boi e pulmão, fígado ou coração bovinos (HORNER & YOUNG, 1982; REINHOLD *et al.*, 1987; BOURIN & LINDAHL, 1993).

Estruturalmente, é composta por unidades alternadas de ácido urônico e glucosamina, sendo unidades de ácido α -L-idopiranosilurônico unidas por ligação (1 \rightarrow 4), unidades 2-amino-2-deoxi- α -D-glucopiranosil e uma pequena proporção de unidades de ácido β -D-glucopiranosil. As unidades são parcialmente *O*-sulfatadas, e a maioria das unidades 2-amino-2-deoxi- α -D-glucopiranosil são *N*-sulfatadas, sendo o restante *N*-acetiladas. A sulfatação ocorre principalmente nos carbonos 2 e 6 das unidades de L-idurônico e da D-glucosamina. Menos freqüentemente pode ocorrer sulfatação nos carbonos 2 e 3 das unidades de ácido D-glucurônico e da glucosamina, respectivamente (LARM *et al.*, 1979; REINHOLD *et al.*, 1987; RAZI *et al.*, 1995).

Inúmeras publicações têm mostrado a grande distribuição da heparina em tecidos de mamíferos (CHARLES & SCOTT, 1933; TOLEDO & DIETRICH, 1977) e também em certos invertebrados (CÀSSARO & DIETRICH, 1977).

A heparina é clinicamente aplicada de três maneiras: (i) em baixa dosagem por injeção subcutânea para profilaxia de trombose venosa; (ii) em dosagem padrão, intravenosamente, para o tratamento de trombose manifesta e (iii) como anticoagulante geral para manutenção da fluidez do sangue na circulação extracorpórea, como em diálise renal (BARROWCLIFFE *et al.*, 1978).

Somente uma porção da heparina em preparações clinicamente empregadas tem afinidade pela AT III. Assim, utilizando-se cromatografia de afinidade com matriz ligada à AT III, a heparina pode ser dividida em uma fração, que corresponde a um terço do total, com alta atividade anticoagulante e outra fração quase inativa (LAM *et al.*, 1976).

O mecanismo de ação da heparina, acelerando a inibição da trombina pela AT III (JORDAN *et al.*, 1980) parece ser mediado por dois processos. A formação de um complexo binário entre a AT III e a heparina induz uma mudança conformacional na AT III que aumenta a associação com a trombina. A interação da heparina simultaneamente com sítios de ligação da AT III e da trombina, em um complexo ternário, diminui a dissociação do complexo binário inicial (TSIANG *et al.*, 1997).

Bioquimicamente, a heparina atua como um catalisador na aceleração da reação da AT III com as enzimas alvo, significando que uma única molécula de polissacarídeo é suficiente para acelerar a formação do complexo entre várias moléculas de AT III e proteinase (JORDAN *et al.*, 1979; JORDAN *et al.*, 1980; GRIFFITH, 1982; PLETCHER & NELSESTUEN, 1983; EVINGTON *et al.*, 1986; OLSON & SHORE, 1986). Este efeito implica na dissociação da heparina do complexo ternário heparina-AT III-proteinase uma vez que um complexo estável entre o inibidor e a enzima tenha sido formado. Ela de fato liga-se ao complexo AT III-trombina com uma afinidade substancialmente menor do que com a AT III (CALSTRÖM *et al.*, 1977, JORDAN *et al.*, 1979; JORDAN *et al.*, 1980; OLSON & SHORE, 1986), mas comparável com a trombina (NORDENMAN & BJÖRK, 1978) ou com o sítio ativo clivado da AT III (BJÖRK & FISH, 1982) que é 1000 vezes menor que a afinidade para a ligação à AT III.

Em contraste, a potencialização na inibição do fator Xa pela AT III é devido à ligação da heparina a AT III, não sendo necessário a formação do complexo ternário (AGNELLI, 1996).

A velocidade da inativação da trombina pela AT III é criticamente dependente do comprimento da cadeia sacarídica da heparina. Moléculas com menos de dezoito monossacarídeos ($MM < 5,4$ KDa) não podem se ligar à trombina e AT III simultaneamente e, assim, são incapazes de aumentar a inibição da trombina pela AT III, embora elas possam, ainda, catalisar a inibição do fator Xa pelo mesmo cofator plasmático (AGNELLI, 1996). Frações de heparina com alta afinidade pela AT III existem em duas formas funcionalmente diferentes: (i) as moléculas de comprimento abaixo do crítico (MCB), que contêm 5 a 17 unidades monossacarídicas e MM menor que 5,4 KDa, e que catalisam a inibição do fator Xa, mas não a inativação da trombina; e (ii) as moléculas de comprimento acima do crítico (MAC), com 18, ou mais unidades monossacarídicas e MM maior que 5,4 KDa e que catalisam a inativação de ambos, fator Xa e trombina (HEMKER & BÉGUIN, 1992).

Nos anos 40, foi assumido que a atividade anticoagulante da heparina era em parte devido à alta densidade de cargas negativas. Essa hipótese foi confirmada pelo achado de que a sulfatação química de polissacarídeos, até então neutros, tornava-os similarmente ativos. Estes componentes com um esqueleto de carboidratos e contendo funções carboxil e / ou sulfato foram chamados de “heparinóides”.

Hoje sabe-se que o efeito anticoagulante da heparina sobre a AT III é devido ao polissacarídeo acelerar em 10 000 vezes a inativação de proteinases da cascata de coagulação por este inibidor (JORDAN *et al.*, 1982).

A afinidade de ligação da heparina com a AT III diminui significativamente com o aumento da força iônica, indicando que interações entre o polissacarídeo negativamente carregado e cargas positivas da proteína são importantes para a afinidade

(NORDENMAN *et al.*, 1978; JORDAN *et al.*, 1979; OLSON & SHORE, 1981; OLSON & BJÖRK, 1991). A análise quantitativa deste efeito tem sugerido que quatro a cinco interações iônicas estão envolvidas, (OLSON & BJÖRK, 1991; OLSON *et al.*, 1992) o que concorda com o número de grupos carregados na sequência pentassacarídica que tem sido mostrada como essencial para a alta afinidade (fig 4). Entretanto, interações não iônicas também contribuem substancialmente para a energia livre da ligação (OLSON & BJÖRK, 1991; OLSON *et al.*, 1992).

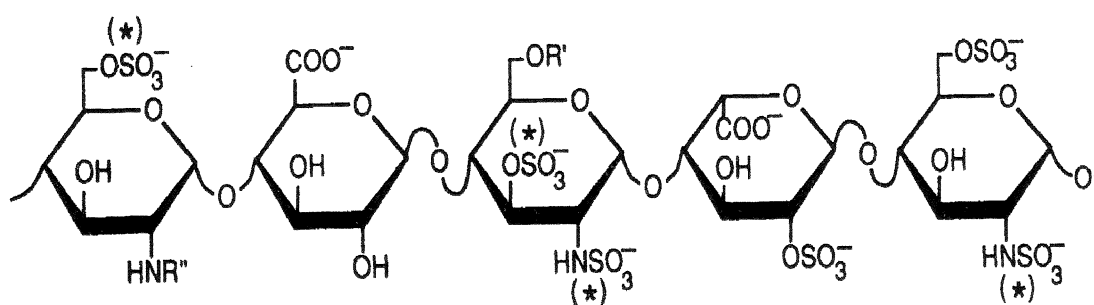


Fig. 4 - **Estrutura da sequência pentassacarídica da heparina a qual se liga à AT III.** Variações estruturais são indicadas por R'(-H ou -SO₃⁻) e R'' (-SO₃⁻ ou -COCH₃). Os grupos sulfato marcados com asterisco têm sido mostrados como sendo essenciais para a ligação de alta afinidade da heparina com a AT III (LINDAHL *et al.*, 1984).

Em 1935, JORPES reportou que a atividade anticoagulante da heparina é dependente do seu conteúdo de sulfato. No entanto, UCHIYAMA *et al.*, em 1990, demonstraram que a atividade anticoagulante da heparina supersulfatada diminuiu significativamente quando comparada àquela da heparina padrão. Tal efeito deve-se à provável ocorrência de sulfatação em posições artificiais junto com posições naturalmente sulfatadas no polissacarídeo, sugerindo que a atividade anticoagulante da heparina, via AT III, não depende somente do seu conteúdo de sulfato, mas também da

posição destes grupamentos na molécula, os quais promovem uma conformação própria que é necessária para a interação.

A seqüência específica contendo um pentassacarídeo (fig. 4) (THUNBERG *et al.*, 1982; CHOAY *et al.*, 1983; ATHA *et al.*, 1984) se liga à AT III com alta afinidade em uma região rica em resíduos de lisina e arginina induzindo uma mudança conformacional que ativa o inibidor (NORDEMANN *et al.*, 1978; NORDEMANN & BJÖRK, 1978; OLSON & SHORE, 1981; GETTINS, 1987; OLSON, *et al.*, 1992). Tal seqüência possui como característica estrutural distinta da região ligante à AT III, a unidade de glucosamina N-sulfato 3-O-sulfatada, que está presente em aproximadamente um terço da cadeia de heparina comercial (RAZI *et al.*, 1995).

GROOTENHUIS & BOECKEL, em 1991, levantaram evidências sugerindo que o sítio de ligação na AT III para os grupos negativamente carregados do pentassacarídeo são compostos dos seguintes resíduos básicos: Arg²⁴, Arg⁴⁷, Lys¹²⁵, Arg¹²⁹ e Lys¹³⁹. No entanto, KRIEDEL & KNAUER em 1997, propuseram um refinamento no modelo do sítio de ligação na AT III para o pentassacarídeo, o qual inclui a Lys¹¹⁴ como um resíduo chave (fig. 5).

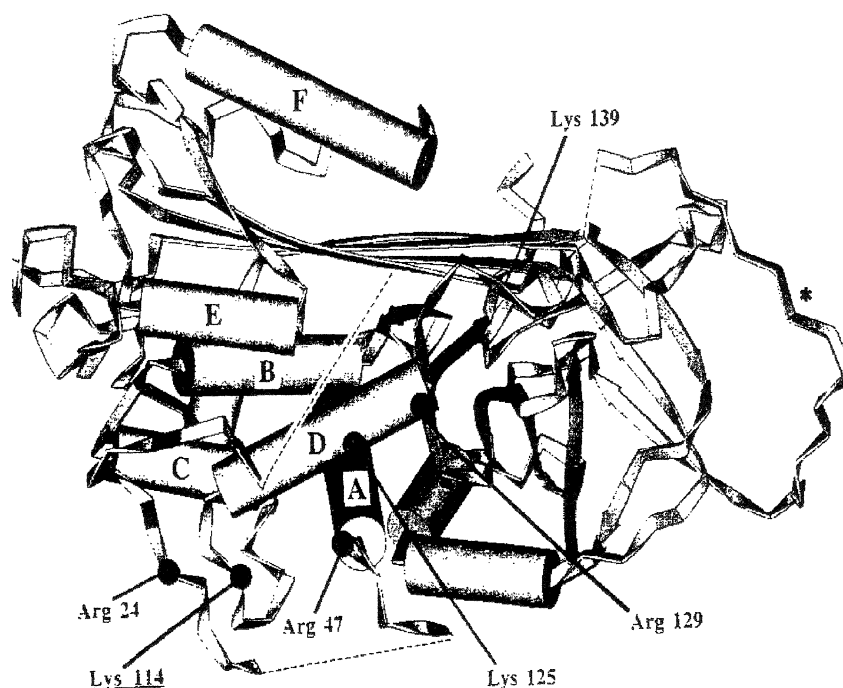


Fig. 5 - **Sítio de ligação do pentassacarídeo na AT III humana.** A posição do sítio de clivagem para a serina protease no centro reativo é representada por uma asterisco (KRIEDEL & KNAUER, 1997).

A ligação $P_1 - P_1'$ do HC II (Leu⁴⁴⁴ - Ser⁴⁴⁵) não é um substrato usual da trombina já que todas as proteinases da coagulação preferem Arg na posição P_1 (GRIFFITH *et al.*, 1985). Assim, na ausência de heparina, o HC II é um fraco inibidor da trombina mas, em presença desta glicosaminoglicana, sofre uma mudança conformacional permitindo que seu domínio N-terminal ácido interaja com o sítio aniônico de ligação da trombina. Esta interação facilita o ataque proteolítico da trombina no sítio ativo do HC II. A taxa de inibição da trombina aumenta mais de nove mil vezes, enquanto a inibição da quimotripsina não é afetada (TOLLEFSEN *et al.*, 1983).

Em 1997, CIACCIA *et al.* sugeriram que a atividade inibitória HC II-trombina está localizada na superfície rica em proteoglicana, uma vez que ambos o HC II e

trombina ligam-se à glicosaminoglicana. Sua co-localização nestes sítios poderia resultar na formação de um complexo ternário concomitante com a reação de inibição.

O efeito potencializador da trombina pelo HC II em presença de heparina parece ser devido, principalmente, ao conteúdo de carga total do polímero (BOURIN & LINDAHL, 1993) sem requerimento de qualquer sequência oligossacarídica específica (GRIFFITH, 1983; PETITOU *et al.*, 1988). SCULLY *et al.* em 1988, observaram que a supersulfatação de heparina, heparan, dextran e condroitin sulfato aumenta a habilidade destes polissacarídeos na ativação do HC II.

Muitas proteínas plasmáticas ou liberadas pelas plaquetas são conhecidas por se ligarem à heparina e assim atuarem como antagonistas do efeito estimulador desta glicosaminoglicana nas reações entre AT III e proteinases. As mais importantes proteínas, baseadas na sua afinidade pela heparina e concentração plasmática são as glicoproteínas ricas em histidina (LIJNEN *et al.*, 1983; PETERSON *et al.*, 1987), fator plaquetário 4, (HANDIN & COHEN, 1976; JORDAN, *et al.*, 1982), vitronectina ou proteína S (PREISSNER & MUELLER-BERGHAUS, 1986; LANE *et al.*, 1987), fibronectina, (HAYAISHI & YAMADA, 1982), e kininogênio de alta massa molecular (BJÖRK *et al.*, 1989). Estas proteínas dividem a habilidade de neutralizar completamente o efeito acelerador da heparina com alta afinidade pela AT III. Seus níveis elevados em alguns pacientes com tromboembolismo pode contribuir para a resistência destes pacientes à heparinoterapia (YOUNG *et al.*, 1992).

Além de retardar a coagulação sanguínea, a heparina possui muitos outros efeitos biológicos, como se ligar a componentes do sistema complemento e fatores de crescimento (WEILER *et al.*, 1992); ação antilipêmica, antihemostática, antihemolítica

e atividade inibitória de algumas enzimas, dentre elas, ATPase DNA polimerase RNA dependente, hialuronidase, elastase, renina e α_1 antitripsina (DIETRICH *et al.*, 1991; NADER & DIETRICH, 1994; FINOTTI & LAURETO, 1997).

Outros trabalhos têm mostrado a atividade antitumoral da heparina e compostos estruturalmente relacionados, causando a regressão de tumor e inibindo metástases (FOLKMAN *et al.*, 1983; COOMBE *et al.*, 1987). Em 1989, MURATA *et al.*, demonstraram que derivados de quitina, quando administrados intratumoralmente ou intravenosamente vários dias antes ou após a excisão do tumor primário, causaram a diminuição no número de colônias tumorais no pulmão em um modelo de metástase pulmonar espontânea.

Em se tratando de atividade tumoral, deve-se, ainda, ressaltar a interação da heparina com o fator de crescimento fibroblástico (BAIRD *et al.*, 1988; TYRREL *et al.*, 1993) e a modulação de crescimento celular (CASTELLOTT *et al.*, 1986).

A atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados foi demonstrada pela primeira vez por GERBER *et al.* em 1958. Esse autor verificou a proteção de ovos embrionários contra o vírus da caxumba e da influenza B por polissacarídeos do grupo ágar, extraídos de *Gelidium cartilagenium*, e do grupo carragenana de *Chondrus crispus*.

A partir de 1981, vários polissacarídeos têm sido testados quanto à sua atividade contra a infecção pelo vírus HIV. Artigos mais recentes têm mostrado a heparina e análogos funcionais como dextrana e curdlana sulfato, como potentes agentes antivirais, inibindo a infecção dos linfócitos T humanos, pelo vírus acima mencionado, por interferir na ligação deste vírus aos linfócitos T CD4⁺ (LEDERMAN *et al.*, 1989). Em

1991, HOLODNIY *et al.* demonstraram que a heparina também pode causar atenuação ou inibição da amplificação do gene do HIV. Tem sido sugerido que a atividade antiviral é devido à carga aniônica total do polímero, podendo a cadeia principal variar desde um polímero simples até um polímero complexo (BABA *et al.*, 1990; DeCLERCQ *et al.*, 1991).

BOEVÉ *et al.*, em 1994, demonstraram a atividade inibitória relativa de vários polissacarídeos sulfatados, heparina e heparan sulfato no crescimento de cristais de oxalato de cálcio em calcilogênese.

Apesar dos conhecimentos benéficos que se tem, a heparina possui muitos efeitos colaterais como hemorragia, trombocitopenia e osteoporose, além de outras desvantagens como heterogeneidade química, variabilidade nos seus efeitos fisiológicos, possibilidade de contaminantes como certos vírus animais (MULLOY *et al.*, 1994), além da supressão das células *natural killer* (JOHANN *et al.*, 1995) que representam o principal mecanismo de defesa contra infecção por vírus e células tumorais (FERRARINI & GROSSI, 1984; HERBERMAN, 1986). Em 1991, GORSKI *et al.* demonstraram a heparina como um inibidor de heparanase causando alterações no tráfego de linfócitos T.

As tentativas de substituir a heparina por outros anticoagulantes não foram bem sucedidas. Recentemente, muitos agentes derivados de glicosaminoglicanas como heparan, dermatan e condroitin sulfato têm sido examinados (VOLPI, 1994; NADKARNI *et al.*, 1996). Entretanto, a maioria destes mostrou fraca ação anticoagulante (DOCTOR *et al.*, 1991; PAVÃO *et al.*, 1995), sendo muitas vezes destituídos de ação antiplaquetária ou tem encontrado sucesso restrito, em função da

dificuldade em estimular a AT III de maneira correta e específica (RAZI *et al.*, 1995). Com o objetivo de eliminar estas diferenças, esforços têm sido feitos para estabelecer novos polímeros cujos aspectos críticos possam ser controlados, como, por exemplo, o comprimento da cadeia, o tipo de ligação glicosídica, o grau de sulfatação e a posição dos grupos sulfato.

Entre os polissacarídeos modificados por sulfatação, destacam-se as glucanas, arabinogalactanas, galactomananas (BODE & FRANZ, 1990), xilanas (HRÌNCOVINI & TORRI, 1995) e dextranas (SIÉ *et al.*, 1996), que têm sido mostrados como prováveis substitutos da heparina, em ensaios *in vitro*.

Outra possibilidade, em tais análises, é a utilização de polissacarídeos naturalmente sulfatados, principalmente originados de algas, como as fucanas isoladas de parede celular de algas marinhas marrons e equinodermos, cuja atividade anticoagulante é variável quando comparada com a heparina, podendo chegar a 85 % em relação a esta (NISHINO *et al.*, 1989; NISHINO & NAGUNO, 1992).

Face ao que se relatou, os Laboratórios do Grupo de Carboidratos da UFPR, em especial os de Biopolímeros e de Líquens, têm se dedicado à extração, análise estrutural e algumas modificações por semi-síntese de polissacarídeos de espécies nativas, pesquisando, quando possível, as propriedades e aplicações destes polímeros. Uma série de heparinóides têm sido produzidos, como exemplos os obtidos por reação de sulfatação a partir de galactomananas de *Cassia fastuosa* e *Mimosa scabrella* (TAVARES, 1995 e GERMANO, 1996); xiloglucana de *Hymenaea courbaril* (LIMA, 1997) e glucanas de *Ramalina celastri* (STUELP, 1997).

Assim, continuando o propósito do grupo e tendo em vista a facilidade da reação de sulfatação, bem como a eficiência dos derivados produzidos por este método, com o presente trabalho visamos à obtenção de outro heparinóide pela modificação química do polissacarídeo obtido do endosperma de sementes de *Senna macranthera*. Em se tratando desta espécie, uma breve descrição botânica será relatada a seguir.

Senna macranthera

O vegetal *Senna macranthera* é uma árvore da família Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae, que apresenta comumente 3 a 9 m de altura, com tronco de 6 a 15 cm de diâmetro. Apresenta, quando em espaço aberto, uma copa arredondada (fig. 6) (IRWIN & BARNEBY, 1982).



Fig. 6 - *Senna macranthera* (HARRI, 1992).

A árvore produz flores amarelas vistosas sendo cultivada como ornamental nas cidades das regiões sul e leste do Brasil e, também, para composição de plantios em áreas degradadas (IRWIN & BARNEBY, 1982).

As folhas são pinadas com até 20 cm de comprimento, compostas de dois pares de folíolos sendo o superior bem maior que o inferior e podem apresentar glândulas atrás dos pulvínulos distais (IRWIN & BARNEBY, 1982).

As flores são dispostas em ráculos carimbosos, abertos, desprovidos de folhas e localizados no ápice dos ramos (IRWIN & BARNEBY, 1982).



Fig. 7 - Flores de *Senna macranthera* (HARRI, 1992).

O fruto é uma vagem de comprimento variando de 15 a 36 cm podendo apresentar de 140 a 208 sementes. Popularmente é conhecida como madurana, pau-fava, aleluia, cabo-verde entre outros (IRWIN & BARNEBY, 1982).

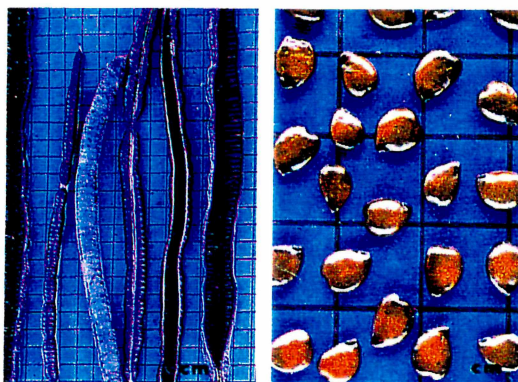


Fig. 8 - Frutos (esquerda) e sementes (direita) de *Senna macranthera* (HARRI, 1992).

CECY, em 1993, demonstrou a ocorrência de heterosídeos saponosídeos na casca do caule e na raiz; de flavonóides nas folhas; de traços de taninos nas folhas, nos frutos e na casca do caule; de compostos esteróides nas folhas e frutos; de traços de alcalóide nas folhas, nos frutos, na casca e no lenho do caule; e de heterosídeos antraquinônicos nos frutos, os quais foram identificados como crisofanol, fiscion e emodina. Ensaio de atividade biológica mostraram a inexistência de ação laxativa nos frutos.

OBJETIVOS

A fim de estudar estruturalmente o polissacarídeo do endosperma de sementes de *Senna macranthera* e produzir um possível heparinóide a partir deste, foram traçados os seguintes objetivos:

1. Extrair e purificar os polissacarídeos hidrossolúveis do endosperma de sementes de *Senna macranthera*;
2. Derivatizar estes polissacarídeos por método químico para a obtenção de derivados sulfatados com diferentes graus de substituição (DS);
3. Determinar o grau de substituição (DS) dos derivados por métodos químicos, físico-químicos e espectroscópicos;
4. Caracterizar o polissacarídeo derivatizado por métodos físico-químicos;
5. Avaliar a possível atividade anticoagulante da molécula, no estado nativo e modificado, bem como a via de atuação na cascata da coagulação pelos métodos de tempo de trombina (TT) e tempo parcial de tromboplastina ativada (APTT), em experimentos *in vitro*.
6. Verificar se o polímero com atividade anticoagulante tem afinidade pela AT III.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. OBTENÇÃO DAS SEMENTES E DOS POLISSACARÍDEOS

Os frutos de *Senna macranthera* foram coletados em vários locais da região metropolitana de Curitiba onde esta espécie é utilizada nas ruas como árvores ornamentais, sendo a sua classificação botânica já estabelecida.

Separadas as sementes, estas foram moídas em liquidificador, com velocidade controlada, até que a casca pudesse ser removida. O embrião e o endosperma contendo, ainda, algum resíduo de casca, foram separados por peneiração seqüencial. A porção contendo o endosperma foi submetida à extração em soxhlet com os solventes: tolueno:etanol (2:1, v/v) por 105 horas e metanol:água por 48 horas. Os produtos solúveis em tais extrações não foram objetivos de estudo, mas o resíduo obtido foi submetido à extração aquosa exaustiva à 25 °C em liquidificador. A solução obtida foi acrescida de NaCl q.s.p. 0,1 Mol/L e precipitada em 2 volumes de etanol. O precipitado obtido foi lavado com etanol e acetona P.A. e seco à temperatura ambiente. Este material foi denominado de SN.

2. PURIFICAÇÃO DA AMOSTRA OBTIDA POR EXTRAÇÃO AQUOSA DO ENDOSPERMA DE SEMENTES DE *Senna macranthera*

2.1. Pré-purificação por centrifugação

O processo de pré-purificação foi realizado por centrifugação a 2 000 g em centrífuga HITACHI modelo HIMAC CR 21-E, por 3 minutos e à temperatura

ambiente, de uma solução 1g/L da amostra (SN) obtida por extração aquosa. Após a centrifugação o sobrenadante foi precipitado e seco como descrito para SN sendo, então, chamado de SP.

2.2. Purificação por passagem em coluna de troca iônica (DEAE-celulose forma Cl⁻)

Uma solução contendo 1g do material parcialmente purificado (SP) em 300 ml de água destilada foi aplicada em uma coluna de DEAE-celulose forma Cl⁻ (3 x 33cm) e eluída sequencialmente com água, NaCl 0,2 Mol/L, NaOH 0,1 Mol/L e HCl 0,1 Mol/L obtendo-se, na seqüência da eluição, as frações FA, FB, FC e FD, respectivamente.

Após as eluições as frações foram neutralizadas, quando necessário, depois dialisadas, concentradas, precipitadas com 2 volumes de etanol, lavadas com etanol e acetona P.A. e secas à temperatura ambiente. Em todas as frações da coluna foi feito controle de açúcar total pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al*, 1956).

3. ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS

3.1. Quantificação de carboidratos e proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método de HARTREE (1972), utilizando-se curva padrão de albumina bovina para as determinações .

A concentração total de carboidratos foi determinada pelo método de fenol ácido-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), a de açúcar redutor, pelo método de SOMOGYI (1945) e NELSON (1944) utilizando-se, em ambos os casos, uma curva padrão de manose e a concentração de açúcares ácidos foi determinada pelo método de BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN, 1973, utilizando-se para a curva padrão o ácido glucurônico.

3.2. Determinação da composição monossacarídica

3.2.1. Hidrólise ácida dos polissacarídeos do endosperma de sementes de *Senna macranthera*

Todas as amostras (10 mg) foram hidrolisadas com ácido trifluoracético (TFA) 1 Mol/L, durante 4,5 horas, em banho de água fervente. Após a hidrólise o TFA foi totalmente evaporado e as amostras foram lavadas com água até remoção total do ácido (ADAMS, 1962 e 1965).

3.2.2. Redução e acetilação dos produtos resultantes do processo de hidrólise

Os monossacarídeos resultantes dos processos de hidrólise foram reduzidos em presença de borohidreto de sódio (NaBH_4) à temperatura ambiente por pelo menos 12 horas. A reação foi neutralizada com ácido acético, tratada com resina LEWATIT S-100 (H^+) e o filtrado foi seco sob baixa pressão à temperatura de 50 °C. O ácido bórico foi eliminado por codestilação com metanol anidro e os alditóis secos foram submetidos à reação de acetilação em presença de piridina e anidrido acético 1:1 (v/v), à temperatura

ambiente durante 15 horas. A reação foi interrompida pela adição de gelo, e os alditóis acetato, extraídos com clorofórmio. Os produtos foram analisados por CG-EM (WOLFROM & THOMPSON, 1963), em um cromatógrafo líquido-gasoso, modelo VARIAN 3300 acoplado à um espectrômetro de massa FINNIGAN MAT, usando uma coluna capilar DB 225 ou OV-225. A temperatura inicial foi de 50 °C seguida de elevação de 4°C/min até 230 °C, sendo utilizado hélio como gás de arraste. Para análise de CG simplesmente, foi utilizado um cromatógrafo líquido-gasoso HP modelo 5890 série 2, com detector e injetor à 250°C e coluna capilar DB-225, à 200°C e nitrogênio como gás de arraste.

3.3. Obtenção dos derivados *O*-metil-alditóis acetato

O polissacarídeo FA, após ter sido previamente acetilado, foi submetido à reação de metilação, tantas vezes quanto necessário, pelo método de CIUCANU & KEREK (1984). Após completa derivatização, monitorada por análises espectroscópicas de infra-vermelho, o polissacarídeo metilado foi parcialmente hidrolisado por metanólise durante 2 horas à 100°C, neutralizado com carbonato de prata, lavado com metanol e secos à temperatura ambiente para, então, ser submetido à hidrólise ácida total com ácido sulfúrico 0,5 Mol/L por 18 horas a 100°C. Os derivados parcialmente metilados, provenientes do processo de hidrólise, foram neutralizados e submetidos às reações de redução e acetilação, como descrito no item 3.2.2. para posterior análise por CG e CG-EM (HARRIS *et al.*, 1984).

3.4. Oxidação com metaperiodato de sódio

A amostra FA (50 mg) foi oxidada com solução de metaperiodato de sódio 0,05 Mol / L, durante 10 dias, à temperatura ambiente e na ausência de luz, sendo agitada ocasionalmente. A reação foi interrompida pela adição de etilenoglicol (0,5 ml), mantendo-se o sistema por mais 40 minutos no escuro. Em seguida, o material oxidado foi reduzido com NaBH_4 e dialisado contra água corrente por 48 horas. A solução dialisada foi concentrada para posterior hidrólise do poliol resultante com TFA 1 Mol/L, como descrito anteriormente (item 3.2.1.1). O material hidrolisado foi reduzido com NaBH_4 , acetilado e analisado por CG-EM (item 3.2.2.) (GOLDSTEIN *et al.*, 1965).

3.5. Determinação da rotação óptica específica

Uma solução de FA na concentração de 0,5 g / L foi analisada quanto à sua rotação óptica específica ($[\alpha]_{25}^D$) em aparelho AUTOPOL III, marca Rudolf Research.

A rotação óptica específica foi calculada através da equação:

$$[\alpha]_{25}^D = \alpha / L \cdot c$$

onde:

α é o ângulo de rotação da luz polarizada, expresso em graus;

L é o caminho óptico, em dm;

c é a concentração da solução em g / L (MATHESON, 1990).

3.6. Determinação da massa molar aparente

Uma solução a 1mg / mL de cada amostra foi filtrada por membranas com poros de 3 e 1,2 μm de diâmetro. Após a filtração as soluções foram concentradas à temperatura de 60°C para o material nativo e 40°C para o sulfatado. O polissacarídeo obtido foi ressuspenso em NaCl 0,15 Mol / L q.s.p. a concentração final de 10 mg/mL.

Uma gota desta solução foi aplicada em uma coluna de SEPHAROSE CL-4B calibrada com padrões de dextrana ($77,8 \times 10^3$ - $2,0 \times 10^6$ g / mol) e eluída com o mesmo solvente. Alíquotas de 1 ml foram coletadas nas quais foi dosado açúcar total através do método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

4. ANÁLISES POR MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

4.1. Espectroscopia de infravermelho (IV)

Os espectros de IV das várias amostras nativas e sulfatadas foram determinados usando um espectrômetro BOMEM, Hartman & Baum-MB, em pastilhas de KBr ou, em clorofórmio utilizando célula de NaCl como suporte, para as amostras metiladas.

4.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN- ^{13}C e RMN- ^1H foram obtidos de um espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE-DRX-400 acoplado a um transformador de Fourier. As amostras foram solubilizadas em água deuterada (D_2O) e o espectro efetuado à temperatura de 70° C para as amostras nativas e 27° C para as sulfatadas. Os

deslocamentos químicos (δ) foram expressos em p.p.m., utilizando-se como padrão dimetil sulfóxido-D₆ (δ 39,7) para a análise de RMN-¹³C e acetona (δ 2,23) para RMN-¹H.

5. SULFATAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A derivatização das amostras pré-purificadas por centrifugação e purificadas por cromatografia de troca iônica foi feita como descrito por O'NEILL, 1955, onde cada amostra é primeiramente dissolvida em piridina e formamida sob agitação em câmara fria. A adição de ácido clorossulfônico foi realizada lentamente, sob agitação constante e em banho de gelo, obedecendo-se a seguinte relação 1 : 20 : 75 : 12, respectivamente, para a massa do polissacarídeo (g), volume (mL) de piridina, formamida e ácido clorossulfônico.

Após a adição completa do ácido, o sistema foi mantido sob agitação à 4°C por mais 24 horas, sendo, em seguida, neutralizado com solução saturada de bicarbonato de sódio e dialisado contra 5 L de água destilada trocada três vezes por dia, durante 5 dias. Terminada a diálise, a solução contendo o polissacarídeo sulfatado teve seu volume reduzido à baixa pressão e temperatura de 40°C, ao qual foi acrescido de NaCl q.s.p. uma solução a 0,1 Mol / L que, em seguida, foi precipitada com 2 volumes de etanol. O polissacarídeo obtido foi, então, lavado com etanol e acetona P.A. e seco à temperatura ambiente.

6. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (DS)

O grau de substituição (DS) foi determinado através do método turbidimétrico por precipitação com cloreto de bário (DOGSON & PRICE, 1962), onde uma amostra do polissacarídeo sulfatado (3 mg) foi hidrolisado em HCl 3 Mols/L, em banho de água fervente por 12 horas. Em seguida, o ácido foi evaporado à pressão reduzida, sendo o resíduo resultante, ressuspenso em água. Uma alíquota de 0,5 ml da amostra foi tratada com 3,8 mL de ácido tricloroacético a 4 % e 1 mL do reagente gelatina-cloreto de bário. A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente por 30 minutos para a formação dos cristais e medida a absorbância à 360 nm. Uma solução de sulfato de sódio foi utilizada para curva padrão, sendo o grau de substituição (DS) calculado a partir do conteúdo de enxofre através da equação abaixo:

$$DS = 162 \times S / 3200 - 102 \times S$$

7. ANÁLISE DAS PROPRIEDADES ANTICOAGULANTES

7.1. Tempo parcial de tromboplastina ativada (APTT)

As várias amostras nativas e sulfatadas antes e após filtração por membranas de poros 3 e 1,2 µm, foram submetidas ao teste do Tempo Parcial de Tromboplastina Ativada (APTT), usando plasma normal humano liofilizado como controle e curva de heparina (183 UI/mg) como padrão. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Pequeno Príncipe em um fibrômetro OPTION, operado a 37°C.

Para o teste, foram incubados 0,02 mL da amostra em questão solubilizada em solução salina 0,9 %, nas diversas concentrações, com 0,08 mL de plasma normal

Para o teste, foram incubados 0,02 mL da amostra em questão solubilizada em solução salina 0,9 %, nas diversas concentrações, com 0,08 mL de plasma normal humano (uniplasmatrol - Biomerieux) e 0,1 mL de cefalina ativada por 4 minutos a 37°C, sendo a reação disparada pela adição de solução de cloreto de cálcio 0,025 Mols / L, sendo marcado o tempo necessário para a formação do coágulo.

7.2. Determinação da afinidade por AT III

As amostras que previamente apresentaram atividade anticoagulante foram aplicadas em uma coluna (5 x 1,5 cm) contendo matriz de agarose-antitrombina Sigma e eluídas com tampão Tris/HCl 0,05 Mols/L pH 7,2 e solução de NaCl 2 Mols/L sequencialmente (CASU *et al.*, 1981). Todas as amostras eluídas foram dialisadas, por pelo menos 14 dias, contra 5 L de água destilada trocada três vezes por dia, sendo posteriormente evaporadas até a secura sob baixa pressão à temperatura de 40 °C e ressuspensas em solução salina para a determinação da atividade anticoagulante pelo teste de APTT.

7.3. Atividade do fator Xa

A atividade do fator Xa foi medida pelo Heptest[®], utilizando-se 0,08 mL de plasma normal humano (uniplasmatrol), 0,02 mL de amostra devidamente diluída e 0,1 mL de fator Xa (0,1 UI). A mistura foi incubada por 120 s, à 37 °C. Em seguida, 0,1 mL de uma solução de cefalina e cloreto de cálcio 1:1 foi adicionada e o tempo de coagulação foi medido (BODE & FRANZ, 1991).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO OBTIDO DAS SEMENTES DE *Senna macranthera*

O endosperma das sementes de *Senna macranthera*, contendo ainda, algum resíduo de casca, após remoção de parte do pigmento e inativação enzimática, induzida por solvente e aquecimento por tratamento em soxhlet com as misturas tolueno : etanol e metanol : água, apresentou um rendimento de 30 % em massa, após moagem e extração com água a 25 °C, precipitação com etanol e secagem. Este material foi chamado de SN.

A composição química da amostra SN em açúcar total e proteína mostrou ser constituída de 85,5 e 6,5 %, respectivamente. A análise qualitativa e quantitativa dos monossacarídeos foi feita por CG-EM e demonstrou a presença de unidades de manose e galactose com razão molar de 3,7:1 (tabela I). Unidades de xilose, arabinose, ramnose e glucose também foram encontradas em menores proporções (tabela I). Observou-se macroscopicamente a presença de um pigmento marrom insolúvel em água, provavelmente oriundo da casca.

Com o objetivo de remover tal pigmento, uma solução a 1g / L de amostra em água destilada foi centrifugada a 2000 g, à temperatura ambiente. Após esta pré-purificação o rendimento em massa obtido foi de 50 % em relação à SN. O pigmento visível na amostra original foi removido por esse processo, e a amostra parcialmente purificada apresentou composição química, em açúcar total e proteína em relação à massa seca, de 80,4 e 3,8 %, respectivamente. Esse material foi denominado de SP, caracterizado através da análise dos acetatos de alditóis, apresentando relação molar

manose : galactose de 3,3:1, além dos demais monossacarídeos que foram identificados em SN. Parte das prováveis outras famílias de galactomananas, presentes em SN, foram retiradas com o resíduo da centrifugação, denominado RS, já que este apresentou proporção manose:galactose de 4,3:1, após a análise dos alditóis acetatos (tabela I).

Tabela I - Análise dos monossacarídeos presentes nos polissacarídeos do endosperma de sementes de *Senna macranthera*.

Amostras	Mol % ¹						Rendimento ²
	Man	Gal	Glc	Xil	Rha	Ara	
SN ³	66,1	17,8	4,9	4,3	4,8	2,0	30
SP ⁴	70,7	21,7	1,2	3,6	n.d.	2,0	15
FA [*]	71,8	26,0	1,0	0,08	0,05	0,06	9,8
FB [*]	55,4	26,5	1,7	12,2	0,05	4,2	0,4
FC [*]	5,8	4,4	44,2	44,9	n.d.	0,6	2,9
FD [*]	59,8	29,5	2,4	1,9	4,6	1,8	0,3

n.d. : não detectado.

¹ Por CG-EM, como alditóis acetatos, coluna OV-225, temperatura 50-220°C.

² Em relação ao endosperma.

³ Amostra nativa.

⁴ Amostra parcialmente purificada por centrifugação (item 2.1).

* Amostras purificadas em cromatografia de troca iônica e eluídas com água, NaCl 0,2 Mols/L, NaOH 0,1 Mol/L e HCl 0,1 Mol/L respectivamente (item 2.2).

A fim de separar melhor a mistura de polissacarídeos contida em SP, esse material foi eluído em coluna de troca iônica DEAE-celulose (forma Cl⁻), obtendo-se quatro frações, denominadas FA (fração aquosa), FB (fração eluída em NaCl), FC (fração eluída em NaOH) e FD (fração eluída em HCl) cujos rendimentos foram, respectivamente, de 65,6; 2,8; 19,5 e 1,8 % em relação à SP.

A análise dos alditóis acetatos da fração FA, que corresponde à eluída com água e, portanto, a um polímero neutro, mostrou que o polissacarídeo é constituído por uma galactomanana praticamente pura com proporção manose : galactose de aproximadamente 2,8 : 1 (tabela I). O principal biopolímero do endosperma de sementes de *Senna macranthera* pode ser caracterizado pela simples razão molar manose : galactose como uma galactomanana pouco substituída. A análise química da amostra FA mostrou a presença de 94,6 % de carboidratos, 3,8 % de proteínas (tabela II) e não foi detectada a presença de açúcares ácidos pela análise de BLUMENKRANZ & ASBOE-HANSEN, 1973.

Tabela II - Composição química e rendimento das frações polissacarídicas obtidas do endosperma de sementes de *Senna macranthera*

Amostras	Açúcar Total ¹ (%)	Proteína ² (%)
SN	85,5	6,5
SP	80,3	5,2
FA	94,6	3,8

¹ Pelo método de fenol-ácido sulfúrico. (DUBOIS *et al.*, 1956)

² Pelo método de HARTREE, 1975.

³ Em relação ao endosperma.

O baixo conteúdo de proteína obtido em SN, SP e FA deve-se à adição de NaCl q.s.p. 0,1 Mol/L nos extratos, antes da precipitação etanólica, o que promoveu *salting in* e, portanto, auxiliou no processo de pré-purificação, conduzindo-se à obtenção de proteoglicanas.

As unidades de açúcares aaminados na natureza ocorrem principalmente no reino animal, onde aparecem como constituintes de um grande grupo de substâncias, os

mucopolissacarídeos ou glicosaminoglicanas (FOSTER & STACEY, 1952). A ocorrência de hexosaminas foi também constatada como componente do exoesqueleto de muitos crustáceos e do esqueleto de vertebrados, formando estruturas resistentes e de alta estabilidade química (GARDELL, 1958). No entanto, após a hidrólise ácida com TFA 5 Mols / L (item 3.2.1.2.) da amostra FA não foi observado qualquer indício da presença de tais unidades.

A análise dos acetatos de alditóis da fração FC, a segunda mais importante em termos de rendimento e que corresponde à eluída com NaOH 0,1 Mol/L, sugere que esta é constituída de uma mistura de polissacarídeos. Entre eles há a possibilidade da existência de uma xiloglucana conforme resultados da tabela I.

Deve-se destacar que os métodos de extração aquosa e purificação, por centrifugação e cromatografia de troca iônica, da galactomanana do endosperma de *Senna macranthera*, constituem processos simples e econômicos.

Na seqüência, para fins de análise estrutural, optou-se pela escolha da amostra FA, que corresponde àquela fração mais purificada.

2. ANÁLISE ESTRUTURAL DA GALACTOMANANA PURIFICADA

2.1. Análise dos *O*-metil-alditóis acetato

Com o objetivo de verificar, quantitativamente, os tipos de ligações glicosídicas presentes no polissacarídeo e avaliar o grau de ramificação, a galactomanana (FA) foi submetida ao processo de metilação, pelo método de CIUCANU e KEREK (1984). Para promover a melhor solubilidade em DMSO, a amostra foi previamente acetilada e os dados obtidos são apresentados na tabela III.

Tabela III - Análise dos alditóis acetatos parcialmente metilados^{a,b} da galactomanana da fração FA.

Derivados parcialmente metilados	Mols %
1,4,5- tri- <u>O</u> -acetil-2,3,6-tri- <u>O</u> -metil manose	40,2
1,5,6- tri- <u>O</u> -acetil-2,3,4-tri- <u>O</u> -metil manose	6,4
1,5- di- <u>O</u> -acetil-2,3,4,6-tetra- <u>O</u> -metil manose	0,7
1,4,5,6-tetra- <u>O</u> -acetil-2,3-di- <u>O</u> -metil manose	26,7
1,5-di- <u>O</u> -acetil-2,3,4,6-tetra- <u>O</u> -metil galactose	26,0

^a Método de CIUCANU e KEREK, 1984.

^b Análise por CG-EM, como acetatos de alditóis, coluna DB-225.

Tendo em vista os resultados obtidos na tabela acima, verificou-se a presença de ligações glicosídicas do tipo (1→4) entre as unidades de manose da cadeia principal que apresentam algumas substituições em O-6 por unidades galactopiranosil e outras por manopiranosil, as quais também estão substituídas no C-6 por unidades galactopiranosil. Essa conclusão deve-se à presença dos derivados parcialmente metilados, a saber: 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-manose que corresponde ao terminal não redutor; 1,4,5,6-tetra-O-acetil-2,3-di-O-metil-manose que corresponde a unidades contendo ligações glicosídicas em O-4 e O-6; 1,5,6- tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-

metil manose que corresponde a unidades de manose contendo ligações glicosídicas em O-6; 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-manose que corresponde a unidades contendo ligações glicosídicas em O-4 e 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-galactose o qual corresponde ao terminal não redutor dessa unidade. Os valores de percentagem molar obtidos para cada derivado confirmam a mesma relação manose : galactose, obtida anteriormente por análise dos monossacarídeos como acetatos de alditóis (tabela I).

2.2. Oxidação com metaperiodato de sódio

A análise estrutural foi complementada pelo processo de oxidação com periodato de sódio que é um dos métodos que auxiliam na elucidação da estrutura química de polissacarídeos. Os resultados obtidos dos produtos analisados como alditóis acetatos (tabela IV) mostram que todas as unidades de galactose presentes no polímero como terminais não redutores foram degradadas, como pode ser observado pela presença de grande quantidade de glicerol.

Tabela IV - Análise da Oxidação com Metaperiodato de Sódio da galactomanana (FA) de sementes de *Senna macranthera*.

	Man	Gal	Eritritol	Glicerol
Mols %	1,0	n.d.	65,0	34,0

Por CG-EM como alditóis acetatos, coluna OV-225.

As unidades de manose foram, também, muito degradadas como pode ser observado pela diminuição de tais unidades e concomitante detecção de grande quantidade de eritritol oriundo daquelas unidades substituídas em O-4 e O-6 (2,3,6-Me₃-Man e 2,3-Me₂-Man).

A presença de glicerol indica que unidades galactopiranosil e manopiranosil substituintes encontram-se ligadas ao “core” de manose por ligações glicosídicas do tipo 1→6.

A análise dos derivados obtidos pela oxidação com metaperiodato de sódio concorda com os resultados obtidos por metilação.

2.3. Rotação óptica específica

Os polissacarídeos ramificados ou substituídos possuem valor de rotação óptica específica dependente das proporções relativas de ligações α -D e β -D, sendo, portanto, a presença de ligações α -D-galactopiranosídicas que confere rotação óptica positiva em galactomananas. Assim, a $[\alpha]_D$ destes polímeros depende do número de ligações β das unidades de manose e α das unidades de galactose, sendo o fator limitante de $[\alpha]_D$, o número de unidades de D-galactose que substituem a cadeia principal de manana (NOBLE, 1986).

A rotação óptica específica obtida para a galactomanana purificada (FA) foi de + 7 °, sendo inferior ao obtido para a galactomanana de *Cassia fastuosa* (+10°) e que apresenta relação molar manose : galactose de 4:1 (GERMANO, 1996). O resultado obtido para a galactomanana de *Senna macranthera* pode ser devido a erros nas determinações experimentais, face à opacidade característica das galactomananas em solução (LESCHZINER & CEREZO, 1969; KOOIMAN, 1972).

2.4. Espectroscopia de ressonância nuclear magnética do carbono treze

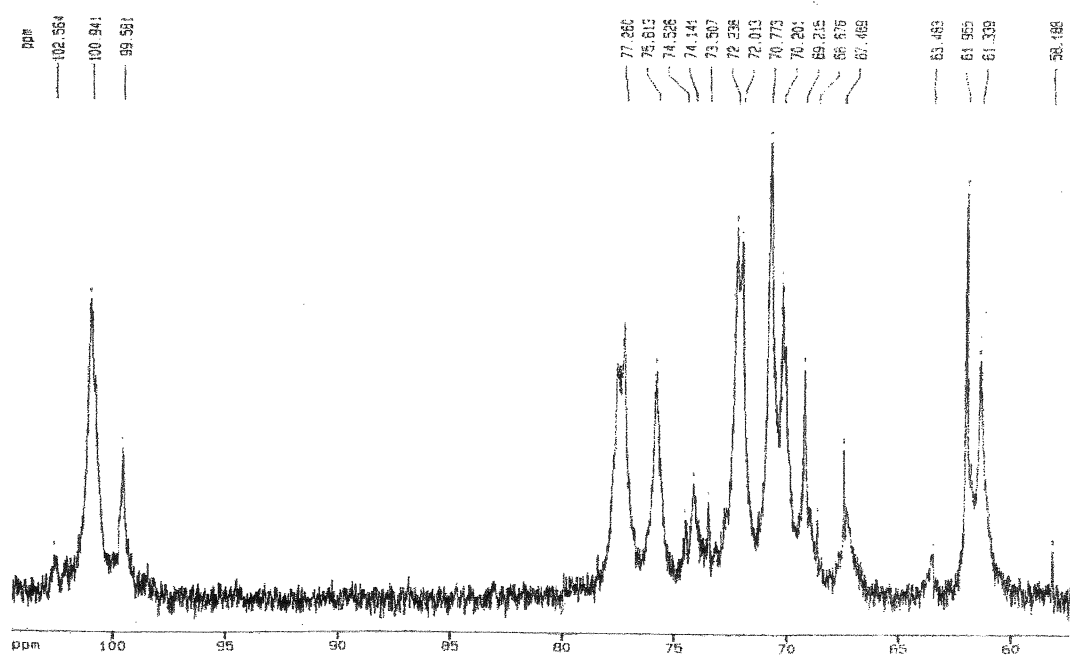


Fig. 9 - Espectro de RMN- ^{13}C da amostra SP obtida do endosperma de sementes de *Senna macranthera*, realizado em solução de óxido deuterado (D_2O), a 70°C . Os deslocamentos químicos são expressos em p.p.m.

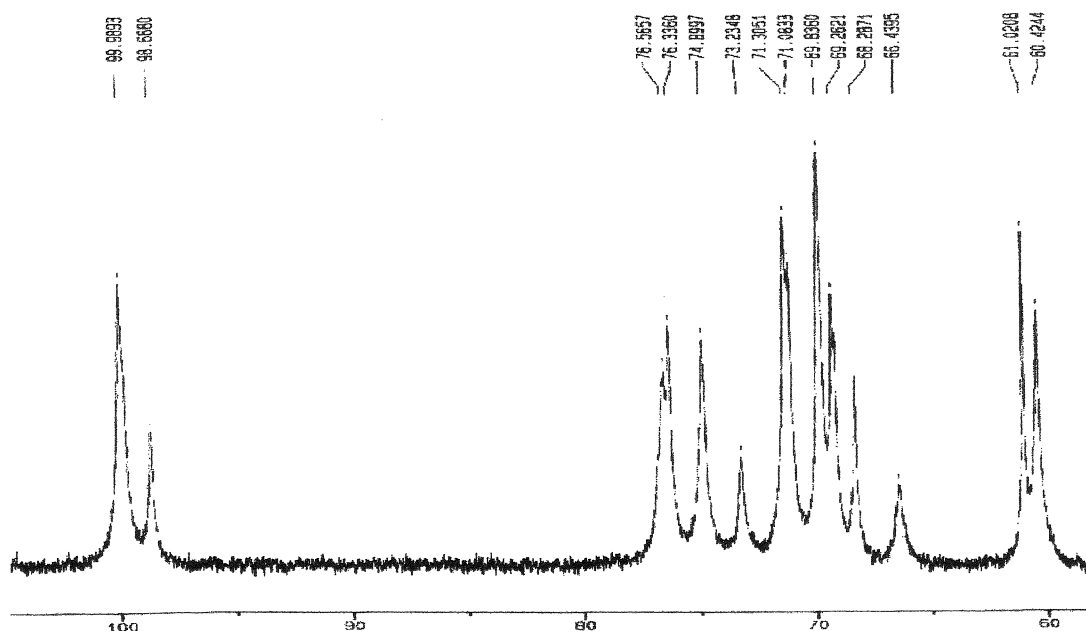


Fig. 10 - Espectro de RMN- ^{13}C da galactomanana do endosperma de sementes de *Senna macranthera* purificada em coluna de DEAE-celulose, fração aquosa (FA), realizado em solução de óxido deuterado (D_2O), a 70°C . Os deslocamentos químicos são expressos em p.p.m.

A região de C-4 das unidades de manose, ampliada na fig. 11, mostra dois sinais, bem característicos, em δ 76,56 e δ 76,33, correspondentes, respectivamente, às regiões das díades de manose não substituídas em O-6, representadas por III, e à região das díades parcialmente substituídas em O-6 por galactose, representada por II. A absorção correspondente às díades de manose totalmente substituídas, representada por I está praticamente sobreposta ao sinal da região II.

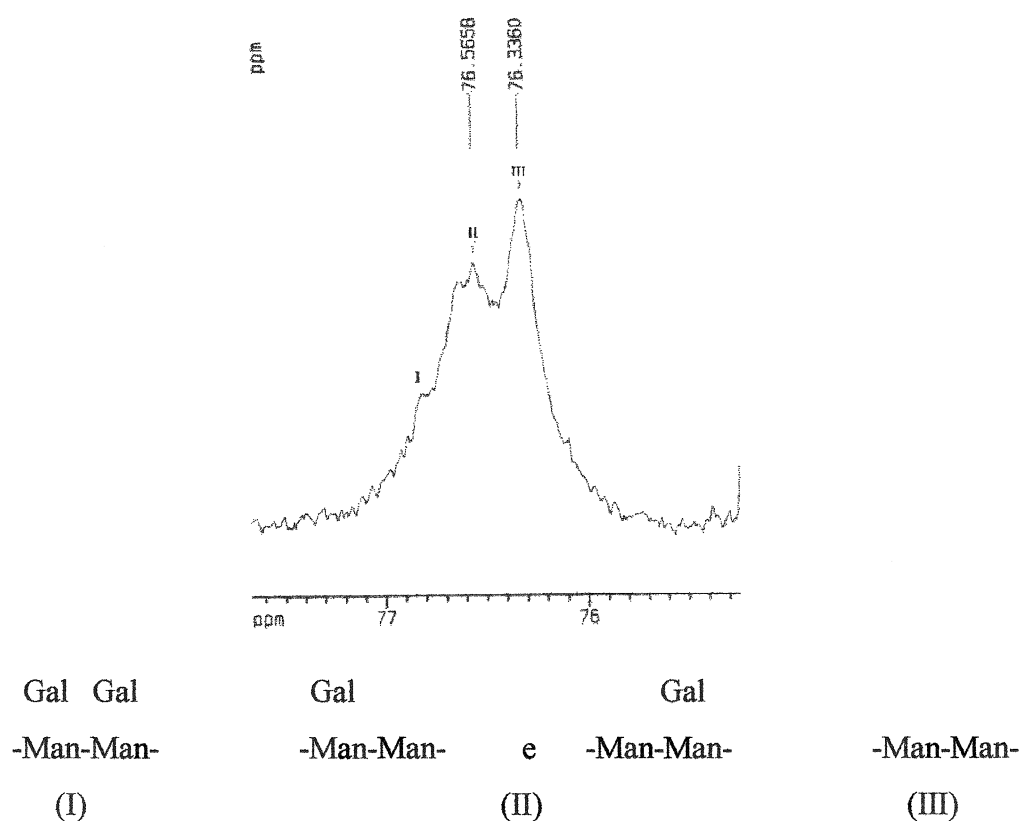


Fig. 11. Região de C-4 ampliada do espectro de RMN- ^{13}C , de unidades de manose da galactomanana purificada do endosperma de sementes de *Senna macranthera*, com as respectivas díades de manose representadas em algarismos romanos.

A absorção mais intensa observada na região de C-4 das unidades de manose não substituída é muito semelhante à obtida para a galactomanana de *Cassia fastuosa* (TAVARES, 1994) e mostra que, também para o polissacarídeo de *Senna macranthera*, há maior percentagem de regiões lisas, ou seja, não substituídas na cadeia.

A região de C-6 foi melhor caracterizada através do espectro do tipo DEPT (fig.12), onde ocorre a inversão dos sinais correspondentes aos carbonos do tipo CH₂. Os sinais em δ 61,0 e δ 60,4 correspondem respectivamente ao C-6 das unidades α -D-galactopiranosose e β -D-manopiranosose não substituídas e os sinais entre δ 66,3 e δ 66,58 correspondem ao C-6 das unidades de β -D-manopiranosose substituídas por galactopiranosose.

O sinal em δ 66,88 corresponde ao C-6 de α -D-manopiranosose substituídas em C-6 por galactopiranosose. O esclarecimento da presença de outros sinais de unidades α -D-manopiranosídicas não foi possível devido à sobreposição dos sinais dessas unidades com aqueles das unidades β , bem como com os sinais de unidades α -D-galactopiranosose.

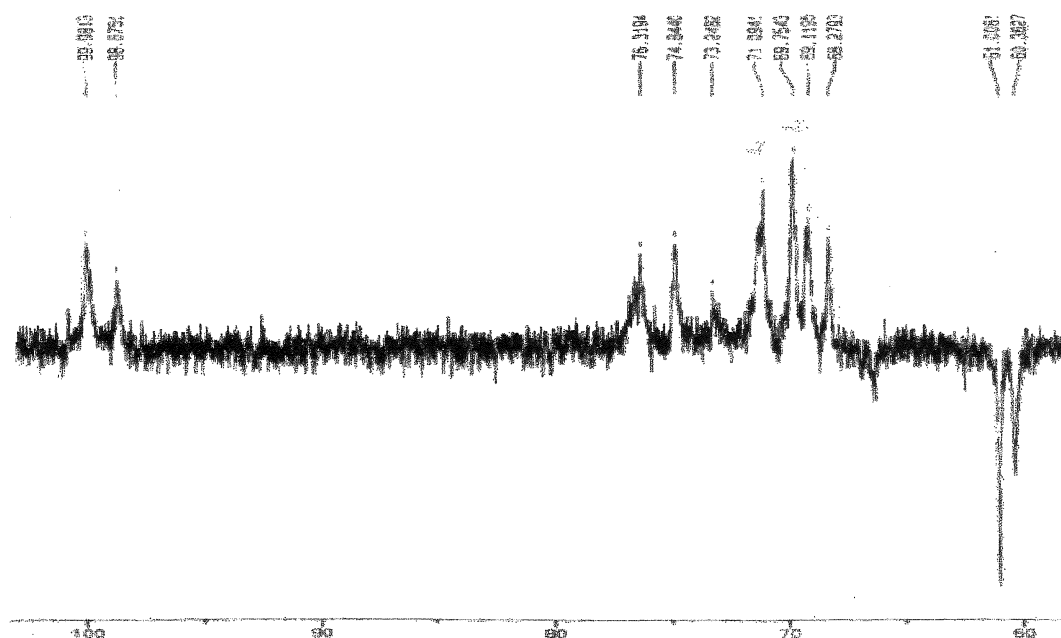


Fig.12 - Espectro de RMN-¹³C do tipo DEPT da galactomanana purificada (FA - ítem 2.2) do endosperma de sementes de *Senna macranthera*, realizado em solução de óxido deuterado (D₂O), a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em p.p.m. utilizando-se como padrão dimetil sulfoxido-d₆ (δ 39,7).

A análise da região anomérica por RMN- ^1H (fig. 13) fornece um sinal em δ 4,76, correspondente a β -D-manopiranoose, bastante largo, devido à distribuição randômica dos substituintes e dois sinais em δ 5,04 e δ 5,05 correspondentes às unidades de α -D-galactopiranoose próximas a uma região pouco substituída e às unidades de α -D-galactopiranoose próximas a uma região bastante substituída, respectivamente. O sinal em δ 4,9 provavelmente corresponde ao C-1 das unidades α -D-manopiranoose.

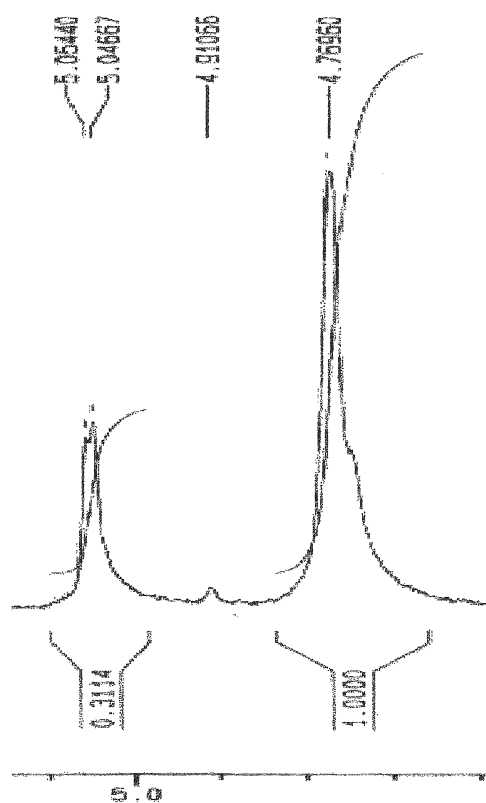
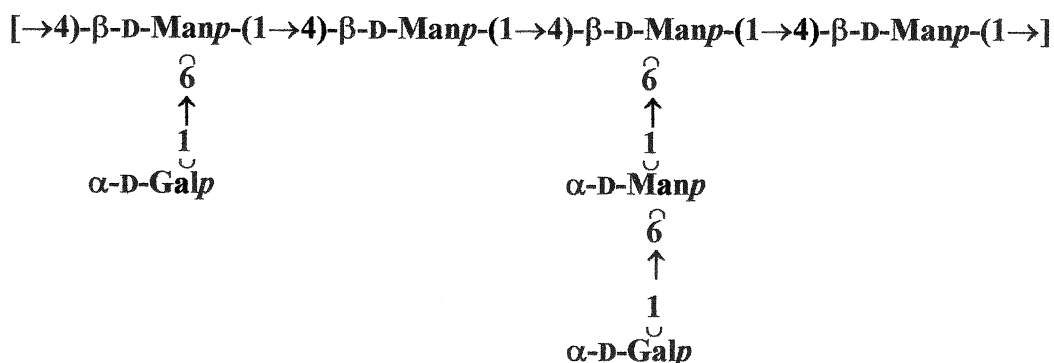


Fig.13 - Espectro de RMN- ^1H da galactomanana purificada (FA - item 2.2) do endosperma de sementes de *Senna macranthera*, realizado em solução de óxido deuterado (D_2O), a 70°C . Os deslocamentos químicos são expressos em p.p.m. utilizando-se como padrão acetona (δ 2,23).

A intensidade dos sinais de manose e galactose confirmam a relação 3:1 entre tais unidades, conforme dados já descritos por outros métodos.

A partir dos resultados apresentados, pode-se sugerir a seguinte estrutura parcial para a galactomanana (FA) do endosperma de sementes de *Senna macranthera*:



Os laboratórios de Química de Carboidratos Vegetais e de Biopolímeros, determinaram nos últimos 10 anos a estrutura de mais de 30 galactomananas, sendo estas constituídas de uma cadeia principal composta por unidades β -D-manopiranosídicas unidas por ligação glicosídica do tipo (1 \rightarrow 4) com substituição em O-6 por unidades α -D-galactopiranosídicas (GANTER, 1993; GOTTARDI *et al*, 1994; TAVARES, 1994; RECHIA *et al*, 1995). Inúmeras outras publicações tem demonstrado que esta estrutura é convencional para galactomananas de leguminosas. No entanto, para algumas espécies na literatura, têm sido demonstrada a possibilidade de ligação glicosídica do tipo (1 \rightarrow 2) e (1 \rightarrow 3) na cadeia principal.

SOUZA LIMA em 1997 demonstrou a presença de galactobiose na cadeia lateral em uma galactomanana presente no endosperma de *H. courbaril*.

Entretanto, ainda não havia sido relatada a possibilidade de unidades α -D-manopiranosídicas em plantas superiores, sendo estas características de fungos e líquens (GORIN & SPENCER, 1972; GORIN & MAZUREK, 1981; GORIN &

IACOMINI, 1984). Assim deve-se ressaltar a necessidade de se confirmar a estrutura sugerida por outros métodos, como, por exemplo, através da análise de oligossacarídeos produzidos a partir de hidrólise ácida parcial ou enzimática.

Com a estrutura acima proposta, as amostras purificada (FA) e parcialmente purificada por centrifugação (SP) foram submetidas ao processo de sulfatação, com o intuito de se fazer uma analogia com a heparina e também com os derivados obtidos destas duas amostras.

3. REAÇÃO DE SULFATAÇÃO

A sulfatação química é um processo bastante eficiente, sendo utilizada piridina como catalisador. Esta aumenta a reatividade dos componentes em solução, por possuir um par de elétrons disponível, e assim formar pontes de hidrogênio com as hidroxilas livres do polissacarídeo, aumentando desta forma a nucleofilia destes grupamentos (O'NEILL, 1955; HAINES, 1976).

A presença de formamida ou outros solventes apolares e apróticos, confere maior solubilidade ao polissacarídeo, sem interferir na efetividade do nucleófilo, constituindo, assim, um reagente adicional importante (YALPANI & STANDFORD, 1987; LANG *et al.*, 1992).

O grau de sulfatação aumenta proporcionalmente com o aumento da temperatura e com a adição de ácido clorossulfônico (SPENCER, 1961; YALPANI & STANFORD, 1987). No entanto, tais condições aumentam, também, a probabilidade de

degradação do polímero e, conseqüentemente, a perda de suas propriedades (O'NEILL, 1955).

Para se poder efetuar uma análise comparativa de derivatização e da atividade biológica proposta no projeto, as amostras SP e FA foram escolhidas para a sulfatação, sendo a primeira submetida a dois processos seqüenciais, que foi feito pela adição lenta de ácido clorossulfônico em banho de gelo com o objetivo de minimizar as reações de degradação.

Para facilitar a representação, os derivados sulfatados de FA e SP foram denominados por SPS e FAS, respectivamente.

4. CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS SULFATADOS

4.1. Análise por infravermelho (IV)

A introdução dos grupamentos sulfato nos derivados foi verificada por espectroscopia de infra-vermelho, que evidenciou a presença de uma banda forte próxima a 1250 cm^{-1} como vibração de alongamento da ligação S=O, característica de todos os ésteres sulfatados (semi-éster) que estava ausente nas amostras nativas. Como modelo para representar tal informação, segue a fig.14, correspondente as amostras nativa e sulfatada de SP.

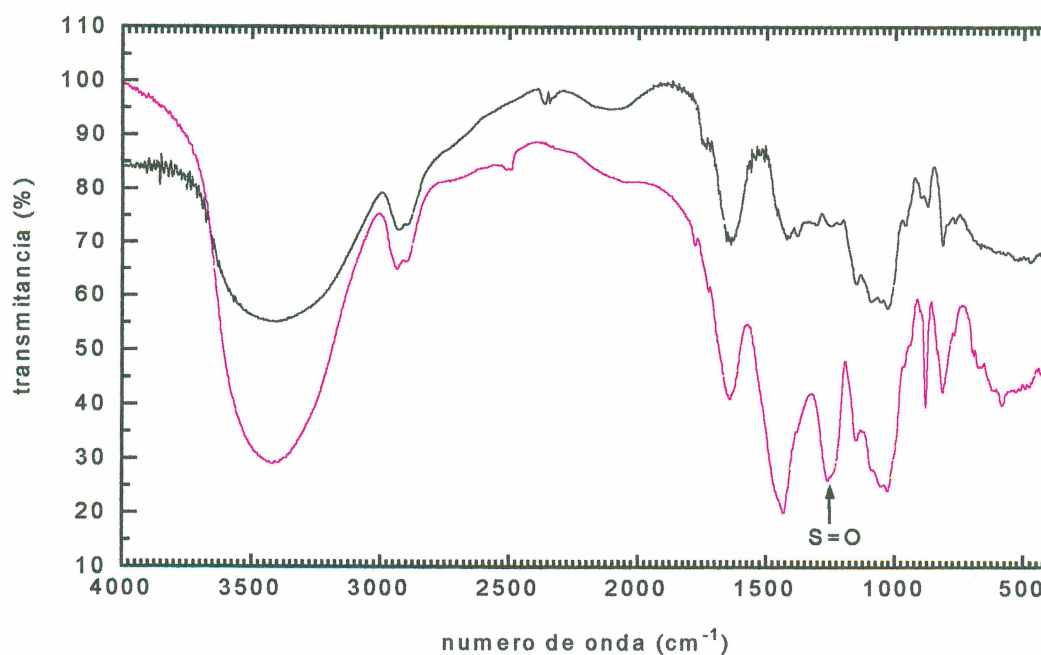


Fig.14 - Espectro de infravermelho em pastilha de KBr da galactomanana parcialmente purificada (___) e do seu derivado sulfatado (___).

A presença do grupo éster sulfato em posição equatorial do carbono primário (C-6) ou secundário pode ser evidenciada por bandas de absorção em $810\text{--}820\text{ cm}^{-1}$ e 830 cm^{-1} , respectivamente (LLOYD & DOGSON, 1961; LLOYD *et al.*, 1961). Por analogia, pode-se sugerir para a amostra SPS, localização dos grupos éster sulfato em posição equatorial de carbono primário pela presença de uma banda de absorção em 820 cm^{-1} . Essa comparação também pode ser feita com os espectros das galactomananas sulfatadas por GERMANO, 1996, que mostraram a presença de bandas de absorção em 818 cm^{-1} correspondentes à D-galactose 6-sulfato, que também está presente nos derivados sulfatados de *Senna macranthera*.

4.2. Rotação óptica específica

Devido à opacidade apresentada pelas soluções em água e NaCl, não foi possível determinar a $[\alpha]_D$ dos derivados sulfatados. No entanto, teoricamente seriam esperados valores diferentes do obtido para a galactomanana nativa, devido à provável mudança conformacional induzida pela introdução dos grupamentos sulfato, a qual poderia expor mais ou menos as unidades α .

4.3. Determinação do grau de substituição (DS)

O grau de substituição das hidroxilas por sulfato foi determinado por método turbidimétrico, o qual permite a avaliação do conteúdo de éster no polissacarídeo.

Esta técnica envolve hidrólise ácida, seguida pela determinação do sulfato inorgânico liberado, o qual forma cristais em presença de bário que podem ser medidos espectrofotometricamente. Trata-se de um método bastante sensível e de fácil execução, sendo, portanto, satisfatório e facilmente reprodutível. Utiliza pequenas quantidades de amostra para a análise, o que pode ser considerado fator limitante.

Conforme a análise espectrofotométrica, os valores obtidos para grau de substituição (DS) das várias amostras são mostrados na tabela V.

Tabela V - Determinação do grau de Substituição (DS) dos derivados sulfatados dos polissacarídeos de *Senna macranthera*.

Frações	DS ¹	% SO ₄
SPS	0,17	9,06
SPS ²	0,54	23,70
FAZ	0,40	18,92

¹ Método de precipitação com cloreto de bário (DOGSON & PRICE, 1962).

² SP com D.S. 0,17 novamente sulfatada.

Com esses resultados observa-se a presença de baixos valores de DS em comparação com outras galactomananas sulfatadas na mesmas condições (TAVARES, 1994; GERMANO, 1996). Isso pode ser devido à baixa solubilidade do polissacarídeo em estudo nos solventes utilizados na reação de sulfatação, como pela provável presença de interações inter e intracadeia (DEA & MORRISON, 1975; DEA, 1977; DEA *et al.*, 1986) e, também, devido a fatores externos como a variação na umidade relativa do ar, a qual pode decompor o ácido clorossulfônico em HCl e H₂SO₄ perdendo, assim, o seu poder sulfatante.

Para facilitar a compreensão, as amostras sulfatadas de SP, com DS 0,17 e 0,54, e de FA, com DS 0,4, serão representadas por SPS-0,17; SPS-0,54 e FAS-0,4, respectivamente.

4.4. Gel permeação

Como os polissacarídeos variam nos tamanhos moleculares e têm conformações em solução que diferem da forma globular da maioria das proteínas, a determinação exata da massa molecular por cromatografia em gel é geralmente impossível. No

entanto, uma estimativa do tamanho molecular pode ser feita por comparação do K_{av} das amostras com o obtido para padrões de dextrana e pululana. (ANDREWS, 1970).

Assim, a análise das massas moleculares das várias amostras de galactomananas nativas e sulfatadas foi realizada por cromatografia em gel permeação em coluna de SEPHAROSE-CL 4B (item 3.6), utilizando-se padrões de dextrana. Nesse experimento notou-se um aumento da massa molecular dos derivados sulfatados em relação às amostras nativas segundo resultados demonstrados na tabela VI, o que pode ser explicado pela adição de grupamentos sulfato nas moléculas.

Observou-se, que as amostras SPS-0,17 e SPS-0,54 apresentaram massa molecular experimental maior que a esperada, sugerindo que a sulfatação promoveu mudança no volume hidrodinâmico maior do que era esperado pela simples introdução de grupamentos sulfato nestes polímeros, o que pode ser oriundo da mudança conformacional ocorrida durante o processo de sulfatação. Por se tratar de uma amostra que contém predominantemente dois polissacarídeos (tabela I), ou seja, uma galactomanana e uma xiloglucana, há uma maior desagregação provocada pelo aumento do DS, conseqüentemente, isso originou uma M_{Ma} calculada e experimental mais próximas para a amostra ressulfatada, que estava mais purificada após a primeira derivatização.

Tabela VI: Massa molecular aparente (MMa) das galactomananas nativas e modificadas obtidas do endosperma de sementes de *Senna macranthera*.

Amostras	MMa ¹ Experimental . 10 ⁶ Da	MMa Esperada ² . 10 ⁶ Da
SP ³	1,2	---
SPS-0,17 ⁴	1,7	1,3
SPS-0,54 ⁵	1,9	1,6
FA ⁶	2,2	---
FAS-0,4	2,4	2,4

¹ Massa molecular aparente, por GPC em relação a padrões de dextrana.

² Calculada matematicamente em função do DS.

³ Amostra parcialmente purificada por centrifugação (item 2.1)

⁴ Amostra parcialmente purificada por centrifugação e sulfatada (item 5)

⁵ Amostra parcialmente sulfatada com DS 0,17 ressulfatada.

⁶ Galactomanana purificada (item 2.2).

Como pode ser observado na tabela VI, a massa molecular aparente obtida para FA foi maior que a obtida para SP, esse resultado sugere que houve alguma mudança conformacional durante a purificação da amostra por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose). Essa observação reforça a sugestão acima de que o volume hidrodinâmico é alterado a cada etapa de desagregação, quer pela purificação, quer pela sulfatação, o que é melhor observado para o derivado FAS-0,4, o qual apresentou valores de massa molecular esperada e experimental idênticos (tabela VI). Isso sugere que, em FA, os grupamentos sulfato estão distantes uns dos outros na molécula, havendo, portanto, somente o efeito da introdução dos substituintes no aumento do volume hidrodinâmico e, conseqüentemente, da massa molar, sem que tenha havido alteração conformacional na molécula pela derivatização. Na figura 15 podem ser visualizados os perfis de eluição semelhantes, obtidos para as amostras FA nativa e seu derivado sulfatado, o que sustenta a proposição sugerida.

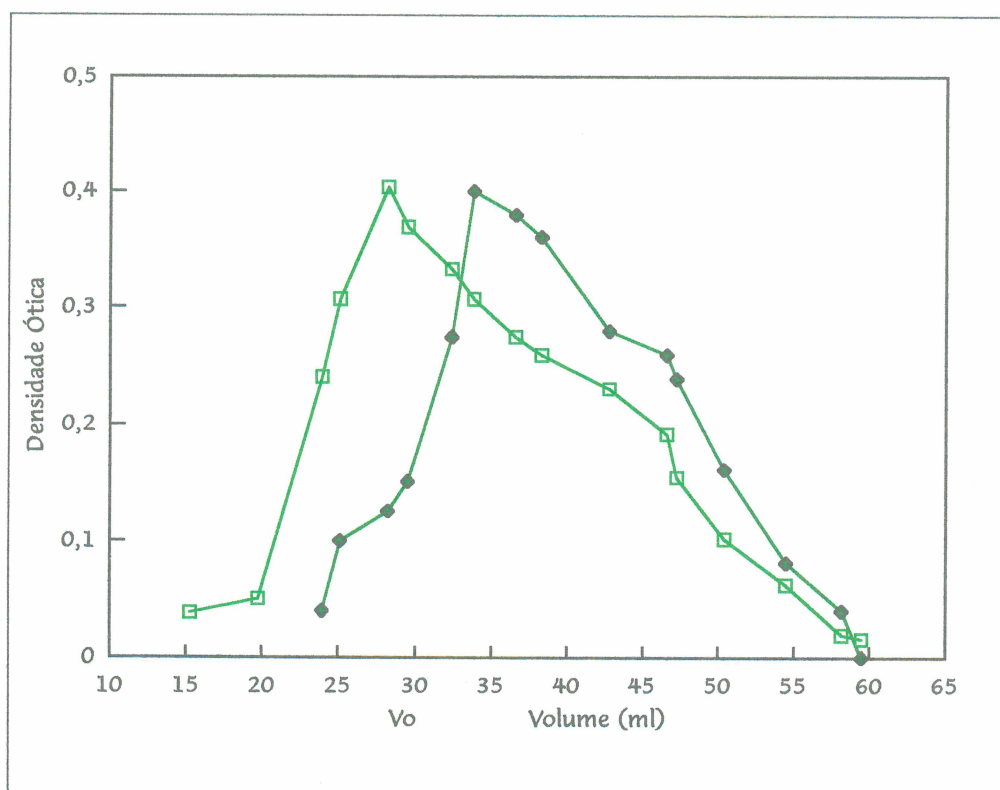


Fig. 15. Perfil de eluição das galactomananas FA (◆) e FAS-0,4 (□). Cromatograma obtido pela eluição das moléculas em Sepharose CL-4B (coluna 62,5 x 1,1 cm), usando como eluente solução de NaCl 0,15 Mol/L, após as amostras terem sido filtradas por membranas de poros 3 e 1,2 μ m de diâmetro.

Deve-se, também, ser salientado que, pelo perfil de eluição de todas as amostras, houve aumento na polidispersão dos derivados sulfatados em relação às frações nativas. Uma explicação para tal comportamento pode ser sugerida, especialmente, pela presença de várias famílias de galactomananas nas amostras, que originaram famílias de derivados sulfatados onde, de alguma forma, em posições neutras, as cadeias interagem entre si por pontes de hidrogênio.

4.5. Espectroscopia de ressonância nuclear magnética do carbono treze dos derivados sulfatados

A análise por RMN- ^{13}C dos derivados sulfatados (fig.16) forneceu espectros com sinais mais alargados e com conseqüente resolução comprometida devido à introdução dos grupamentos sulfato, os quais diminuem a mobilidade molecular, dificultando a aquisição dos sinais.

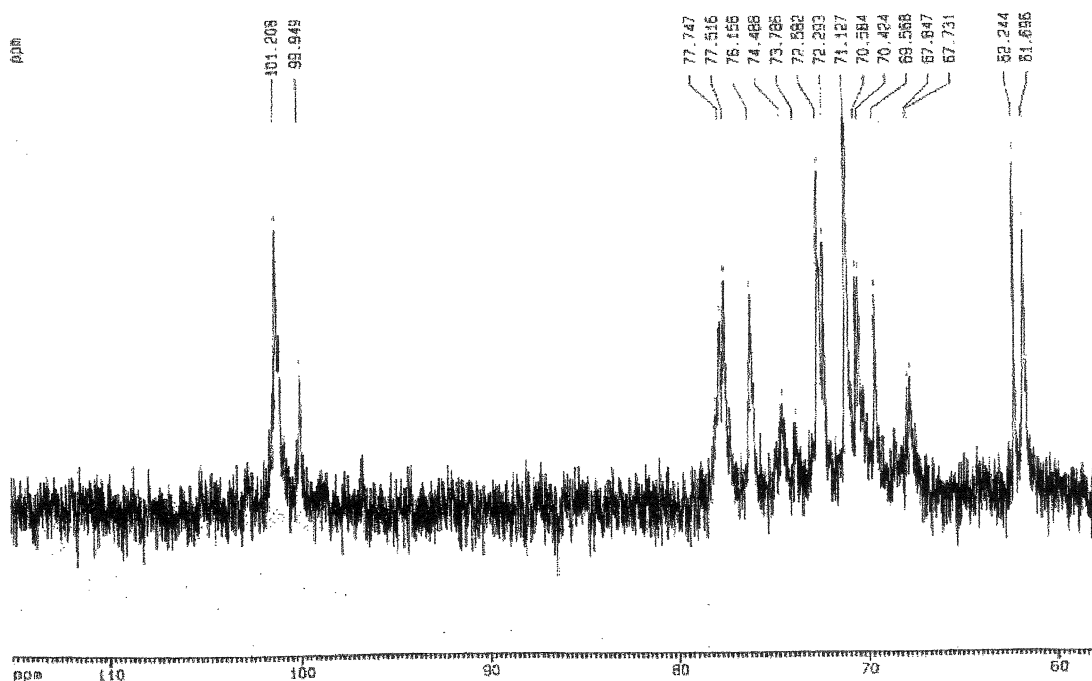


Fig. 16 - Espectro de RMN- ^{13}C da amostra SPS-0,17 (item 5), realizado em solução de óxido deuterado (D_2O), a 70°C . Os deslocamentos químicos são expressos em p.p.m. utilizando-se como padrão dimetil sulfóxido- D_6 (δ 39,7).

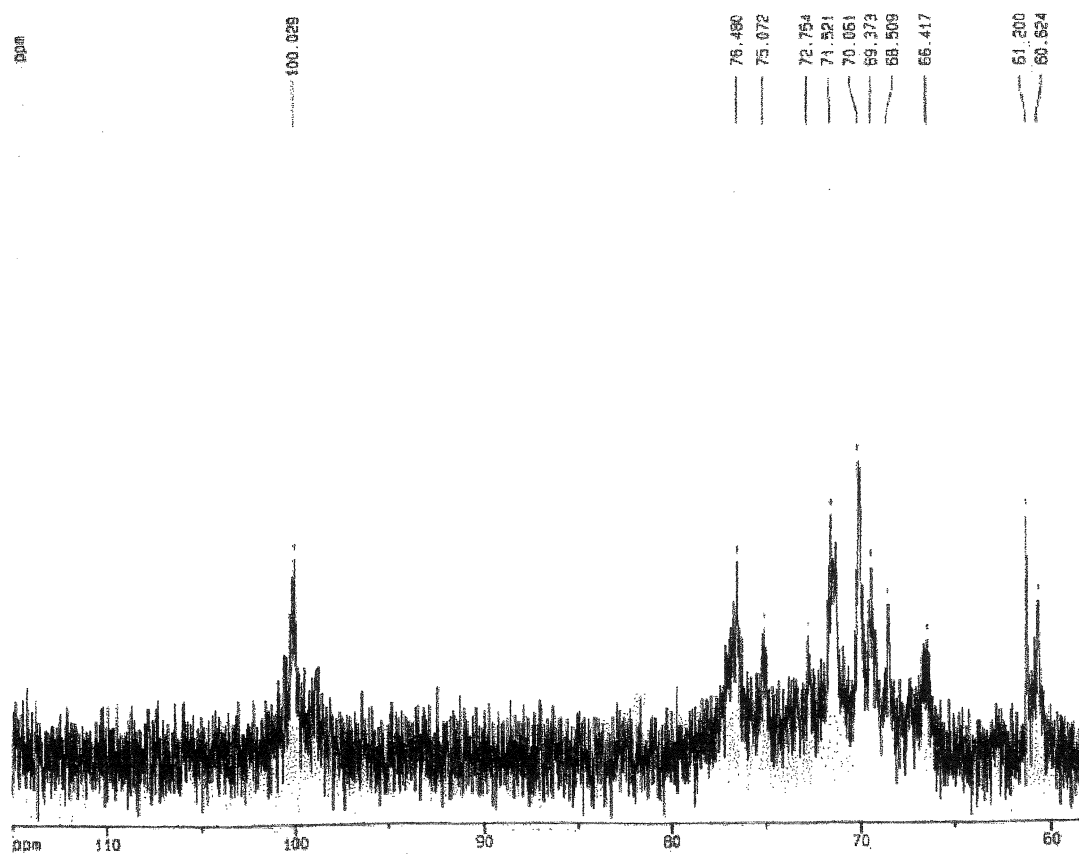


Fig 17 - Espectro de RMN- ^{13}C da amostra SPS-0,54 (item 5), realizado em solução de óxido deuterado (D_2O), a 70°C . Os deslocamentos químicos são expressos em p.p.m. utilizando-se como padrão dimetil sulfóxido- D_6 (δ 39,7).

Os espectros obtidos para as amostras SPS-0,17; SPS-0,54 e FAS-0,4, apresentaram diminuição da intensidade de absorção na região do C-6 livre das unidades de galactose e manose. Por exemplo, para o espectro de FAS-0,4 quando comparado ao do polímero original observou-se uma relação man : gal livre no primeiro de 1,71 : 1, enquanto no nativo essa relação era de 2,7 : 1.

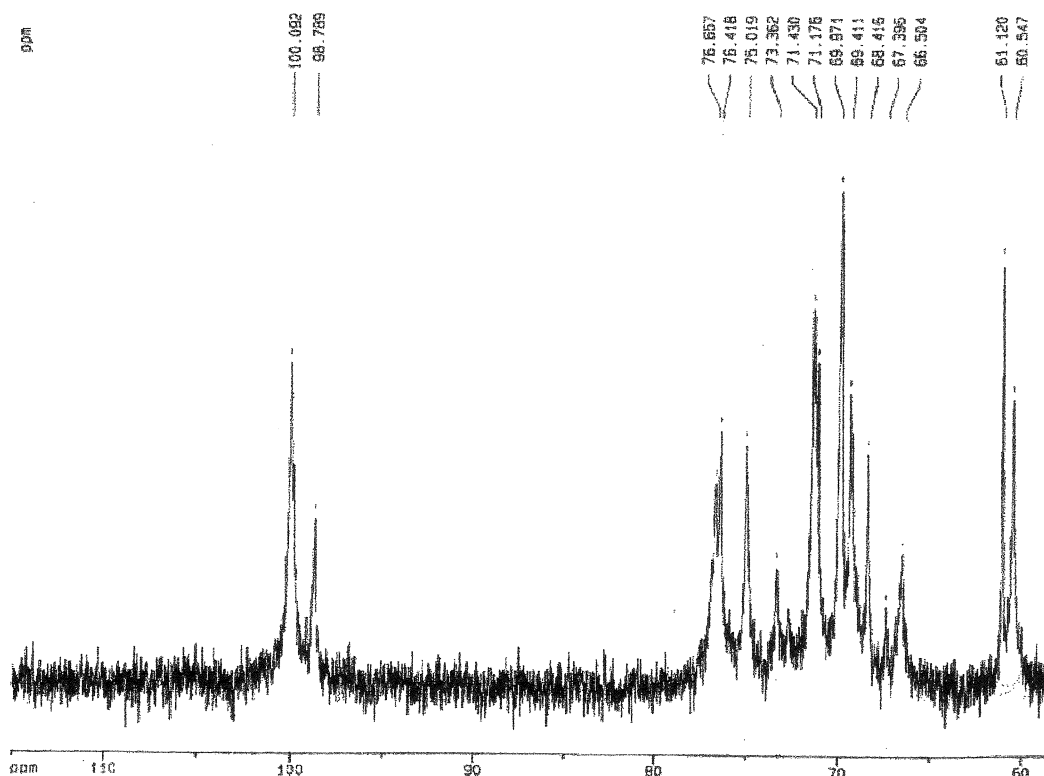


Fig. 18 - Espectro de RMN- ^{13}C da amostra FAS-0,4 (item 5), realizado em solução de óxido deuterado (D_2O), a 70°C . Os deslocamentos químicos são expressos em p.p.m. utilizando-se como padrão dimetil sulfóxido- D_6 (δ 39,7).

O aparecimento dos sinais em δ 68,4 (para SPS-0,17), δ 67,4 (para SPS-0,54) e δ 67,4 (para FAS-0,4), correspondem ao C-6 das unidades de galactopirranose substituído por sulfato, sendo que absorção semelhante é encontrada no espectro de polissacarídeos sulfatados de algas, onde essas unidades substituídas em O-6 por sulfato apresentam sinais nesta região (DOCTOR & ESHO, 1983; ROCHA, 1982).

Analisando-se a região de C-6 substituído para unidades de manopirranose observa-se maior número de sinais em δ 67,8 (SPS-0,17); δ 66,91 (SPS-0,54) e δ 66,6 (FAS-0,4). Esses resultados sugerem substituição por grupamentos sulfato também nos C-6 de unidades de manopirranose.

Uma vez caracterizada parcialmente a posição dos substituintes, segue-se a discussão com os ensaios de atividade anticoagulante *in vitro*.

5. DETERMINAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTICOAGULANTE *in vitro*

A integridade da via comum da coagulação é medida pelo tempo de trombina (TT), também conhecido por teste anti-fator IIa. Este método consiste em adicionar-se ao plasma citratado do paciente, uma quantidade conhecida de trombina, a qual atua sobre o fibrinogênio formando monômeros de fibrina. A agregação espontânea de tais monômeros produz um gel que é estabilizado pela formação de interligações entre as cadeias de diferentes moléculas na fibra, por ligações peptídicas entre cadeias laterais de glutamato e lisina, em uma reação de transamidação (DOOLITTLE, 1984). De um modo geral, o tempo de trombina normal está compreendido entre os valores de 10 a 15 segundos.

Entretanto, devido ao seu alto custo e, também, à pouca sensibilidade do observada para heparinóides derivados de galactomananas e xiloglucanas (LIMA, 1997), este método não foi utilizado neste trabalho de tese como método para a avaliação da propriedade anticoagulante.

Assim as várias amostras sulfatadas foram testadas quanto à sua atividade anticoagulante pelos testes de APTT (item 7.1) e Heptest (item 7.3).

O tempo de tromboplastina parcialmente ativada (APTT) baseia-se na ativação do mecanismo intrínseco da coagulação sanguínea, através da cefalina, um substituinte plaquetário, e da adição de cálcio ao plasma a ser testado. Geralmente os valores

normais para este teste estão compreendidos entre 30 e 40 segundos (FIRSCHBACH & FOGDALL, 1985; AIZU, 1991; BOURIN & LINDAHL, 1993).

Nos experimentos realizados pelo teste APTT foram utilizadas concentrações variáveis de polissacarídeo, sendo a de 155 $\mu\text{g/mL}$ de plasma a concentração máxima em todos os ensaios. Os resultados foram convertidos em razão APTT através da divisão do tempo obtido para cada concentração de polissacarídeo pelo tempo do controle de plasma. Os resultados em razão APTT foram, então, comparados aos obtidos para heparina padrão (183 UI / mg, DS 0,6), podendo-se assim expressar tais resultados em UI / mL. Como pode ser observado na figura 19, as amostras de polissacarídeo nativo foram utilizadas como controle.

A partir de dados anteriores dessa discussão, verificou-se que SP possui outros polissacarídeos em sua composição, além da galactomanana e, embora as frações possuam composição distinta, pôde-se observar que a atividade anticoagulante foi dependente do DS (fig. 19). Comportamento similar foi observado em trabalhos anteriores da literatura para NISHINO & NAGUNO, 1992 e STUELP, 1997.

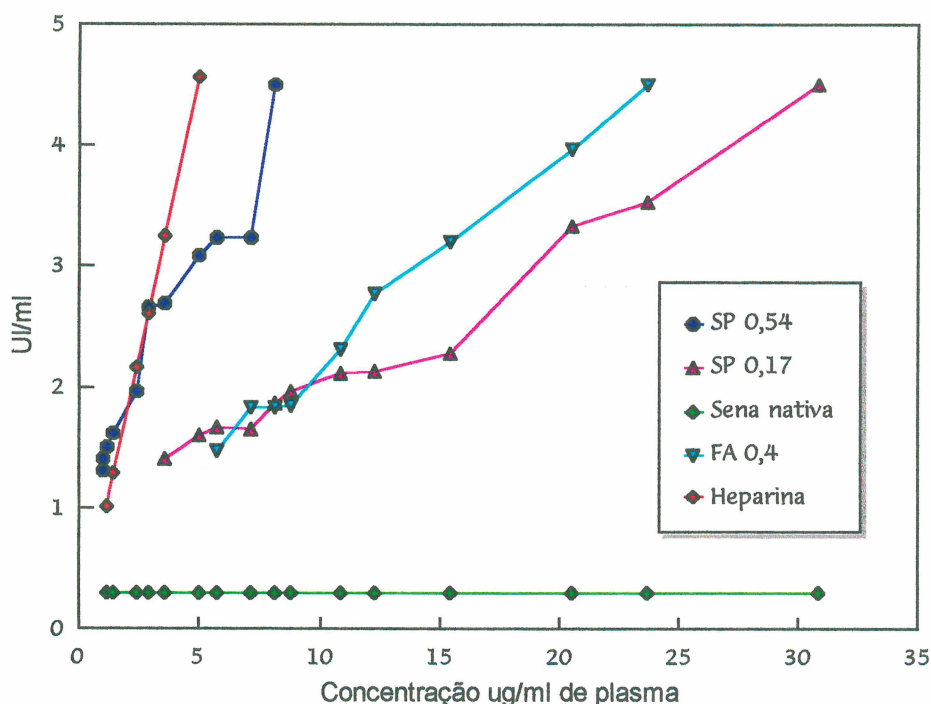


Fig. 19 - Atividade anticoagulante medida pelo teste de APTT das amostras nativas e sulfatadas de SP e FA. Heparina (-♦-); SP e FA nativos (-♦-); SPS-0,57 (-o-); SPS-0,17 (-△-) e FAS-0,4 (-■-). O teste foi realizado com uniplasmatrol (Biomerieux), em um fibrômetro OPTION, operado a 37 °C. Os resultados são expressos através da razão do tempo de coagulação da amostra em relação ao plasma normal. Para esse teste, o tempo máximo utilizado foi de 120 s e a unidade amostral foi 4.

Deve-se ressaltar que a atividade anticoagulante dos derivados de SP pode ser, portanto, em parte devido à sulfatação dos outros polissacarídeos constituintes (tabela I), além da atividade da própria galactomanana sulfatada presente na mistura.

Para o derivado sulfatado de FA pode-se sugerir que a atividade anticoagulante é devido à sulfatação da galactomanana nos C-6 das unidades de manose e de galactose.

Com a finalidade de purificar melhor as amostras sulfatadas, estas foram filtradas e os resultados comparativos, antes e após o processo de filtração por membrana (poros 3 e 1,2 μm), estão demonstrados na tabela VII e nas figuras 20, 21.

Tabela VII - Concentração (m/v) para atividade anticoagulante máxima dos derivados sulfatados medida pelo teste de APTT¹

Derivado	µg/mL de plasma²
SPS-0,17	31
SPS-0,17 PM[*]	24
SPS-0,54	8
SPS-0,54 PM[*]	7
FAS-0,4	20
FAS-0,4PM[*]	20

- Realizado em fibrômetro operado a 37°C, utilizando-se como controles as amostras nativas e um pool de plasma normal humano. Para os testes foi utilizado kit da Biolab-Biomerieux.

* Derivados sulfatados filtrados por membranas de poros 3 e 1,2 µm.

¹Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada.

² Concentração necessária para atingir a mesma atividade que a heparina com 4,57 UI/mL que corresponde a uma Razão APTT de 3,55 ou a um tempo máximo de coagulação de 120 segundos.

Com esses valores, observou-se que os derivados sulfatados de SP filtrados por membrana (figs. 20 e 21) apresentaram atividade anticoagulante, em relação ao ponto 4,57 UI/mL de plasma, 35 e 13 % maior que a obtida para os derivados não filtrados SPS-0,17 e SPS-0,54, respectivamente.

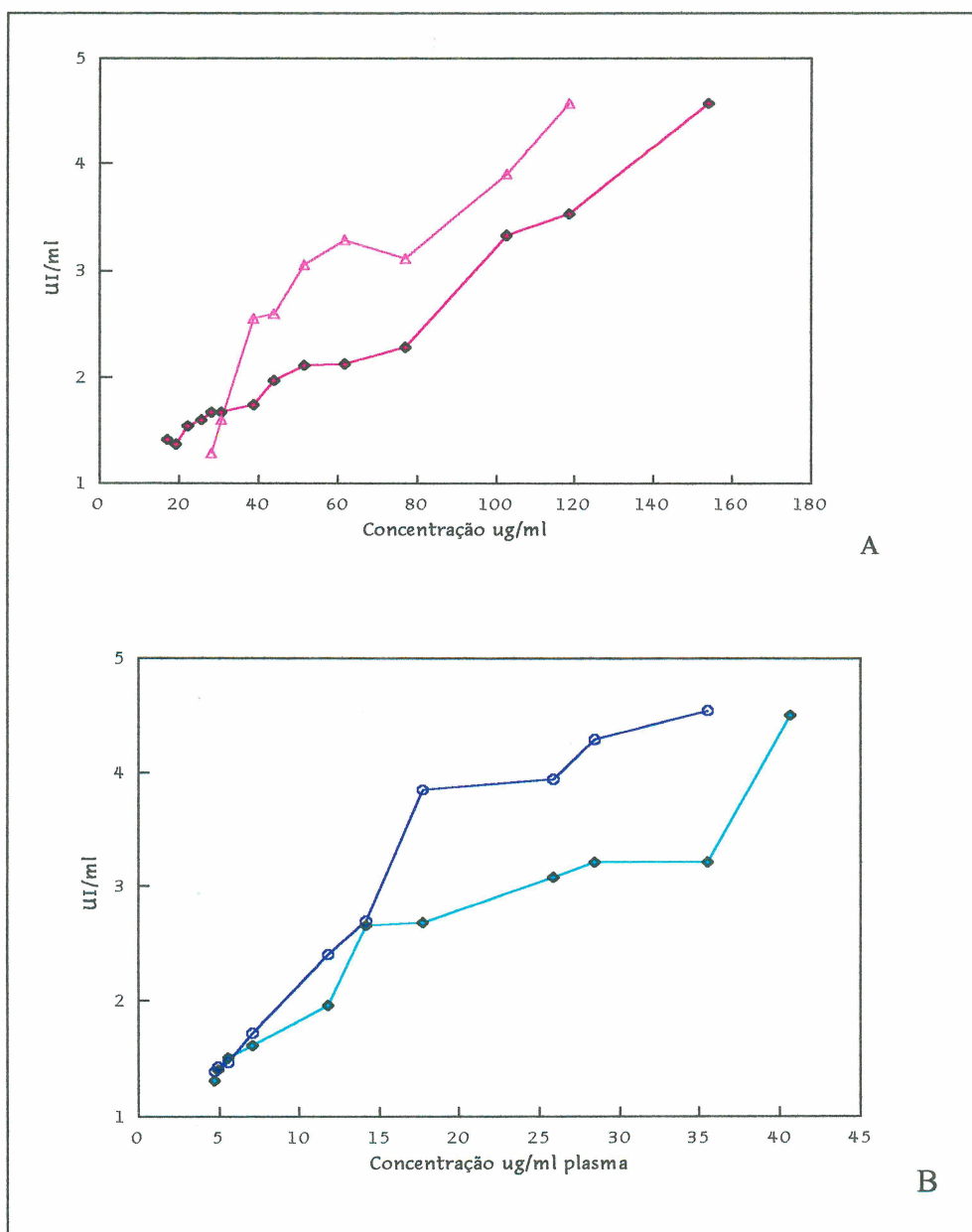


Fig. 20 - **Atividade anticoagulante medida pelo teste de APTT.** (A) Derivado sulfatado SPS-0,17 antes (-♦-) e após (-△-) a filtração em membranas de póros 3 e 1,2 μm de diâmetro. (B) Derivado sulfatado SPS-0,54 antes (-◆-) e após (-○-) a filtração em membranas de póros 3 e 1,2 μm de diâmetro. Os testes foram realizados com uniplasmatrol (Biomerieux), em um fibrômetro OPTION, operado a 37 °C. Os resultados são expressos através da razão do tempo de coagulação da amostra em relação ao plasma normal. Para esse teste, o tempo máximo utilizado foi de 120 s e a unidade amostral foi 4.

Tal aumento deve-se, provavelmente, à remoção de possíveis agregados durante o processo de filtração. Este efeito de massa foi menor para o derivado de SPS-0,54

(fig. 22), em comparação com o SPS-0,17, provavelmente devido à melhor desagregação do material durante o processo de ressulfatação, conforme já discutido.

Não foi observado alteração significativa na atividade anticoagulante para o derivado sulfatado de FA antes e após a filtração (fig. 21), provavelmente, pela prévia purificação e desagregação de FA durante a cromatografia de troca iônica (item 2.2), além daquela ocorrida durante o processo de sulfatação.

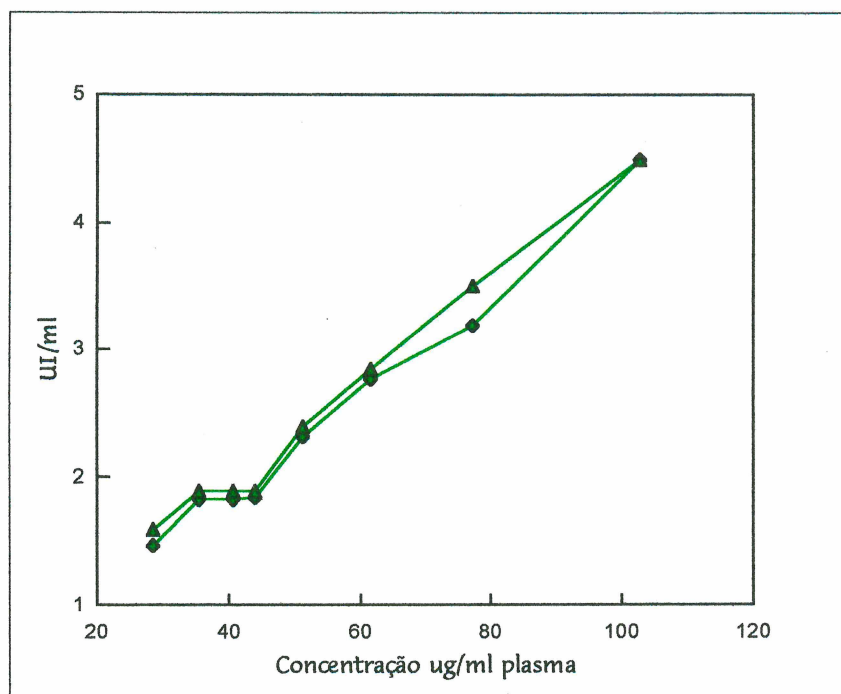


Fig. 21 - **Atividade anticoagulante medida pelo teste de APTT.** Derivado sulfatado FAS-0,4 antes (-Δ-) e após (-◆-) a filtração em membranas de póros 3 e 1,2 μm de diâmetro. O teste foi realizado com uniplasmatrol (Biomerieux), em um fibrômetro OPTION, operado a 37 °C. Os resultados são expressos através da razão do tempo de coagulação da amostra em relação ao plasma normal. Para esse teste, o tempo máximo utilizado foi de 120 s e a unidade amostral foi 4.

Apesar do efeito da sulfatação na atividade anticoagulante permanecer pouco explorado, acredita-se que os heparinóides, pela analogia funcional com a heparina, possam atuar de maneira semelhante à ela. Assim, a atividade anticoagulante pode ser

devido à alta densidade de cargas no polieletrólito atuando sobre o cofator II da heparina (HC II) por interação eletrostática e / ou devido a uma sequência específica de carga negativa, a qual atuaria como um catalisador na reação da AT III com serina proteases, favorecendo a exposição do sítio de ligação da antiprotease.

Outra possibilidade seria a quelação do cálcio, o qual é necessário para a estabilização do fator V, polimerização dos monômeros de fibrina (LAUDANO & DOOLITTLE, 1981) e muitas reações proteolíticas (MORITA & JACKSON, 1979). No entanto, esta hipótese é descartada pela utilização de cálcio em concentração de teste mil vezes superior à necessária para ser completamente quelada pelos derivados sulfatados nos ensaios de atividade.

A propriedade anticoagulante dos heparinóides produzidos a partir do endosperma das sementes de *Senna macranthera* poderia ser, ainda, decorrente de interações diretas entre o polissacarídeo e enzimas da cascata da coagulação como foi observado para glucanas sulfatadas que são capazes de inibir diretamente a ação da trombina (ALBAN *et al.*, 1995).

Na tentativa de se descobrir o possível mecanismo de ação dos derivados sulfatados SPS-0,54 PM e FAS-0,4 PM, foi verificada a afinidade destes pela AT III, através de cromatografia de afinidade utilizando-se matriz de agarose ligada à AT III (item 7.2). As amostras eluídas com tampão Tris/HCl apresentaram apenas traços de sulfato, sugerindo que estas frações provavelmente sejam constituídas do material que ficou mais insolúvel durante a reação de sulfatação. Enquanto as amostras que só foram eluídas pelo aumento da força iônica, através da eluição com NaCl, ou seja, as amostras que se ligaram à AT III, apresentaram valores de DS de 1,8 e 1,6 para as amostras FA

PM e SP PM respectivamente, tendo havido aumento relativo nos valores de DS já que foram separadas as moléculas que não estavam sulfatadas. Com relação às atividades anticoagulantes, as frações eluídas foram testadas quanto à sua pelos testes de APTT e Heptest (tabela IX).

O Heptest mede a taxa de inibição do fator Xa e como esta inibição ocorre pela ação da AT III, testando-se a afinidade da anti-protease (AT III) por este fator, pode-se verificar a interação específica do polissacarídeo com a AT III que, por sua vez, irá inibir o fator Xa (BROWN, 1984).

Após a eluição dos derivados de SPS-0,54 PM e FAS-0,4 PM, com tampão Tris / HCl pH 7,2 (ítem. 7.2), foram recuperados, respectivamente, 70 e 66 % em massa, sendo que as frações recuperadas, que não ficaram retidas na matriz de agarose ligada à AT III, foram testadas na concentração de 1000 µg / mL de plasma e não apresentaram qualquer atividade anticoagulante medida pelo teste de APTT.

As frações retidas pela AT III só foram removidas pelo aumento da força iônica, com NaCl 2 Mols / L como eluente, e corresponderam a 27 % e 32 % m/m de SPS-0,54 PM e FAS-0,4 PM, respectivamente. Tais frações, nos testes de APTT (tabela IX) apresentaram atividade anticoagulante com uma diminuição em massa de 71,4 % para SPS-0,54 PM e 84 % para FAS-0,4 PM, em relação aos derivados sulfatados não fracionados de SPS-0,54 PM e FAS-0,4 PM, respectivamente.

Tabela VIII - Atividades anticoagulantes dos derivados sulfatados pós cromatografia em coluna de agarose-AT III.

Derivado	APTT ¹ μg/mL de plasma ²	APTT UI/mL de plasma	Heptest μg/mL de plasma ³
SPS-1,8 NaCl*	2,3	9,7	2,1
SPS-0,0019 Tris ^o	n.d.	---	---
FAS-1,4 NaCl*	3,7	6,0	3,5
FAS-0,12 Tris ^o	n.d.	---	---
Heparina	4,9	4,6	4,3

¹ Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada.

² Concentração necessária para atingir a mesma atividade que a heparina com 4,57 UI/mL plasma que corresponde a uma Razão APTT de 3,55, a uma concentração de 24,5 μg/mL de plasma ou a um tempo máximo de coagulação de 120 segundos para o APTT.

³ Concentração necessária para atingir a mesma atividade que a heparina com 7,9 UI / mL de plasma que corresponde a uma concentração de 4,3 μg/mL de plasma ou a um tempo máximo de coagulação de 300 segundos para o Heptest.

- Realizado em fibrômetro operado a 37°C, utilizando-se como controles as amostras nativas e um pool de plasma normal humano. Para o teste APTT foi utilizado kit da Biolab-Biomerieux (item 7.1) e, para o Heptest, fator Xa da Sigma (item 7.3).

^o Amostras eluídas com tampão Tris / HCl pH 7,2 (item 7.2).

* Amostras eluídas com NaCl 2 Mols/L (item 7.2).

Com esses experimentos, pode-se comparar as atividades anticoagulantes obtidas para os derivados sulfatados eluídos com NaCl com as obtidas para as galactomananas sulfatadas de *Cassia fastuosa* e *Mimosa scabrella* com DS de 0,87 e 1,13, respectivamente, e que embora não tenham sido fracionadas, apresentaram tempo de coagulação de 120 segundos, pelo teste APTT, com concentrações de 50 e 40 μg/mL respectivamente.

As amostras FAS-0,4 PM e SPS-0,54 PM eluídas com NaCl, aceleraram a taxa de inibição do fator Xa pela AT III como pode ser observado na tabela IX, confirmando

a interação específica do polieletrólito com a antiprotease. A maior atividade encontrada para o derivado de SP em comparação ao de FA, deve-se provavelmente à presença de maior grau de substituição.

Para melhor compreensão da relação estrutura-atividade, foi feita a análise dos espectros de RMN-¹³C obtidos para as amostras SP e FA sulfatadas, pós cromatografia de troca iônica e eluídas com tampão tris / HCl pH 7,2, que mostraram a ausência do sinal correspondente ao C-6 das unidades de galactose substituídas por sulfato, como esperado pelo baixo DS encontrado (fig. 22 e 23). O espectro obtido para FAS pós coluna de AT III foi muito semelhante à fração mãe, FA nativa, enquanto que, para o espectro obtido para SPS, a diferença maior é com relação ao aumento da intensidade de C-2 das unidades de galactopirranose, mesmo considerando que a amostra corresponde a uma mistura de dois polímeros principais (tabela I).

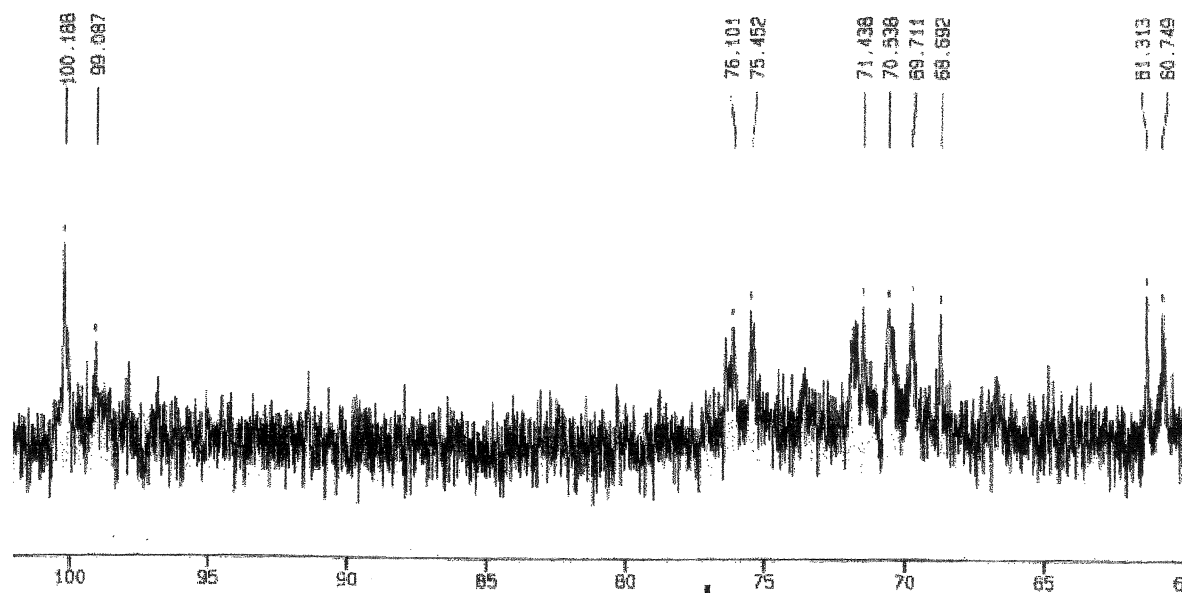


Fig. 22 - Espectro de RMN- ^{13}C da amostra SPS-0,54 PM e eluída em coluna de agarose-ATIII com tampão Tris/HCl pH 7,2 (SPS-0,0019 Tris - item 7.2), realizado em solução de óxido deuterado (D_2O), a 70°C . Os deslocamentos químicos são expressos em p.p.m.

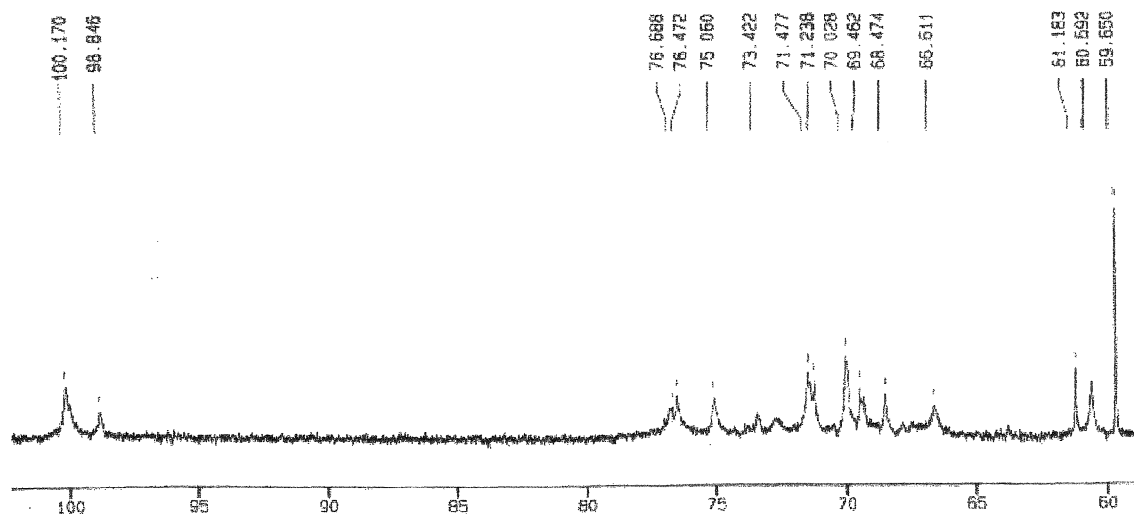


Fig. 23 - Espectro de RMN- ^{13}C da amostra FAS-0,4 PM e eluída em coluna de agarose-ATIII com tampão Tris/HCl pH 7,2 (FAS-0,12 Tris - item 7.2), realizado em solução de óxido deuterado (D_2O), a 70°C . Os deslocamentos químicos são expressos em p.p.m..

Em se tratando das amostras eluídas com NaCl, não foi possível a aquisição dos sinais correspondentes à galactomanana sulfatada da fração FA purificada (FAS). No entanto, a análise do espectro obtido para o derivado da amostra SP (fig. 24) sub-fractionado em coluna com AT III, mostra sinais de C-6 de unidades de manopirranose (δ 66,4) e galactopirranose (δ 67,0) substituídas, cujas intensidades são muito superiores ao obtido para esta amostra antes do fracionamento por cromatografia de afinidade (fig. 18). A presença de grupamento sulfato em outras posições também deve ser considerada, devido ao D.S. de 1,8, apresentado por esta amostra, bem como pelo aparecimento de sinal em δ 97,06 correspondente ao C-1 de unidade substituída por sulfato em carbono secundário.

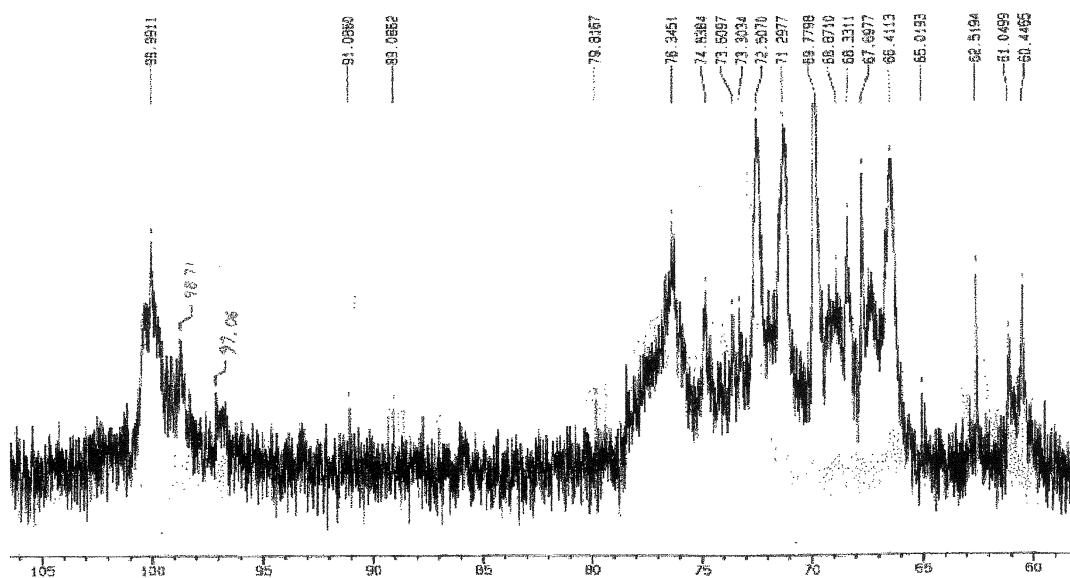


Fig. 24 - Espectro de RMN- ^{13}C da amostra SPS-0,54 PM eluída em coluna de agarose-ATIII com NaCl 2 Mols/L (SPS-1,8 NaCl - item 7.2), realizado em solução de óxido deuterado (D_2O), a 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em p.p.m.

No entanto, pelo alargamento dos sinais e complexidade observada nos espectros obtidos para as frações sulfatadas, não foi possível a localização de substituição em outras posições além do carbono primário.

Assim, pode-se sugerir que o mecanismo de ação dessa galactomanana sulfatada preferencialmente nas posições C-6 de unidades de manose e de galactose se dá por interação com a AT III, provavelmente induzindo uma mudança conformacional nesta e, assim, favorecendo a interação com serina-proteinases da coagulação e consequentemente inativando-as.

Com essas análises, pode-se sugerir que o DS interfere na afinidade da galactomanana sulfatada pela AT III, como já descrito para a heparina e outros polissacarídeos sulfatados (JORPES, 1935; SCULLY *et al.*, 1988, NISHINO & NAGUNO, 1992).

Entretanto, não se descarta a possível interação da galactomanana sulfatada com o HC II, o qual poderia estar, também, contribuindo para a atividade anticoagulante, por se tratar de um polímero altamente carregado; ou a interação direta do polímero sulfatado com proteases da cascata da coagulação sangüínea.

BIACHINI *et al.* demonstraram, em 1985, uma ausência de correlação entre atividades *in vitro* medida pelos testes de APTT e TT, e atividade antitrombótica *in vivo*. Por exemplo o heparan sulfato, o qual mostra atividades farmacológicas desprezíveis *in vitro*, é um potente agente antitrombótico *in vivo*, podendo-se concluir que os testes *in vitro*, não podem predizer a atividade antitrombótica *in vivo*.

Assim, outros estudos ainda devem ser realizados para verificar se a propriedade anticoagulante da molécula em questão também estará presente com os mesmos

resultados em ensaios *in vivo*, bem como a possível utilização de oligossacarídeos do polieletrólito em estudo, para se verificar outras posições sulfatadas que também são responsáveis pela interação específica com a AT III, além daquelas dos carbonos primários.

Deve-se também ressaltar a importância de se fazerem testes *in vivo* com a amostra SPS, não só por ter mostrado resultado melhor que FA, provavelmente devido ao seu maior DS, mas, também por apresentar maior rendimento e pela ausência da purificação por cromatografia de troca iônica, sendo, portanto, economicamente mais viável.

Em se tratando da atividade *in vitro*, pode-se considerar os resultados obtidos como sendo bastante interessantes, principalmente, para a utilização dos polissacarídeos sulfatados na manutenção da fluidez do sangue em ensaios de bioquímica clínica e hematologia. Neste casos, ainda precisam ser estudadas possíveis alterações celulares, provocadas pelas moléculas em questão, para garantir a viabilidade da sua utilização.

CONCLUSÕES

1. Os polissacarídeos obtidos por extração aquosa do endosperma de sementes de *Senna macranthera* apresentaram rendimentos de 30 e 15 % para as amostras bruta (SN) e parcialmente purificada por centrifugação (SP) em relação à massa seca. A amostra SP foi purificada por cromatografia de troca iônica obtendo-se duas frações principais, um neutra eluída com água (FA) e outra aniônica eluída com NaOH (FB) com 65,6 e 19,5 % de rendimento, respectivamente, com relação à SP.
2. A análise dos acetatos de alditóis mostrou que o polissacarídeo FA possui relação molar manose : galactose de aproximadamente 3 : 1 e o polissacarídeo FB apresentou relação molar glucose : xilose de 1 : 1, sugerindo que estes polímeros sejam constituídos de uma galactomanana e uma xiloglucana, respectivamente.
3. A análise estrutural da fração FA mostra que esta é composta por uma cadeia principal de unidades de manose ligadas β -(1 \rightarrow 4) com 26,7 mols % das unidades substituídas por unidades de galactose e 6,4 mols % por unidades de manose na posição O-6, sendo as últimas também substituídas por unidades de galactose na posição O-6 conforme determinado por análise dos *O*-metil-alditóis acetato por CG-EM, e por oxidação com metaperiodato. O espectro de RMN-¹³C mostrou a presença de sinais em δ 99,99; δ 99,8 e δ 98,67 correspondentes ao C-1 das unidades de manopirranose não substituídas; substituídas e α -D-galactopirranose, respectivamente. Os sinais observados na região de C-4 (δ 76,33) indicaram maior ocorrência de díades de manose não substituídas.
4. Após a sulfatação das amostras SP e FA, foram obtidos os derivados SPS-0,17, SPS-0,54 e FAS-0,4. A M.M.a. obtida em relação a padrões de dextrana para as amostras nativas foi de 1,2 para SP e 2,2 MDa para FA; e 1,7; 1,9 e 2,4 MDa para as amostras

SPS-0,17, SPS-0,54 e FAS-0,4, respectivamente. Apesar da complexidade dos espectros, a análise por RMN-¹³C mostrou que a substituição ocorreu preferencialmente nos carbonos primários das unidades de β -D-manopiranosose e α -D-galactopiranosose.

5. As amostras sulfatadas apresentaram atividade anticoagulante dependente do DS, medida pelo teste de APTT. Os derivados SPS 0,54 PM e FAS-0,4 PM, foram eluídos em matriz ligada à AT III e aproximadamente 30 % da massa total das amostras sulfatadas apresentaram afinidade pela AT III imobilizada. As frações dos derivados que não ficaram retidas na cromatografia de afinidade (SPS-0,0019 Tris e FAS-0,12 Tris) não apresentaram qualquer atividade anticoagulante. As amostras com afinidade pela AT III SPS-1,8 NaCl e FAS-1,4 NaCl aceleraram a taxa de inibição do fator Xa pela antiprotease medida pelo Heptest, podendo-se concluir que a galactomanana sulfatada atua na cascata da coagulação por interação específica com a AT III.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G.A. Acid hydrolysis of weak linkages. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 1, p. 21-31, 1962.
- ADAMS, G.A. Complete acid hydrolysis. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 269-276, 1965.
- AGNELLI, G. Pharmacological activities of heparin chains: should our past knowledge be revised ? **Haemostasis**. v. 26 (suppl. 2), p. 2-9, 1996.
- AIZU, Y. The relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulphates from the brown seaweed. *Eckonia Kurome*. **Agric. Biol. Chem.**, Tokio, v. 55, n. 3, p. 791-796, 1991.
- ALBAN, S.; JESKE, W.; WELZEL, D.; FRANZ, G.; FAREED, J. Anticoagulant and antithrombotic actions of a semisynthetic β -1,3-glucan sulfate. **Thrombosis Res.**, v. 78, n. 3, p. 201-210, 1995
- ATHA, D. H.; STEPHENS, A.W. & ROSEMBERG, R. D. Evaluation of critical groups required for the binding of heparin to antithrombin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 81, p. 1030-1034, 1984.
- BABA, M.; PAUWELS, R.; BALZARINI, J.; DECLERCQ, E. Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.**, v. 85, p. 6132-6136, 1988.
- BAIRD, A.; SCHUBERT, D.; LING, N. & GUILLEMIN, R. Receptor and heparin binding domains of basic fibroblast growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.**, v. 85, p. 2324-2328, 1988.

- BARROWCLIFFE, T. W. ; JONHSON, E. A.; THOMAS, D. Antithrombin III and heparin. **Brit. Med. Bull.** v. 34, p. 143-154, 1978.
- BIANCHINI, P.; OSIMA, B.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Lack of correlation between *in vitro* and *in vivo* antithrombotic activity of heparin fractions and related compounds. Heparan sulfate as an antithrombotic agent *in vivo*. **Thrombos. Res.**, v. 40, p. 597-607, 1985.
- BJÖRK, I. & FISH, W. W. Production *in vitro* and the properties of a modified form of bovine antithrombin, cleaved at the active site by thrombin. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 9487-9493, 1982.
- BJÖRK, I.; OLSON, S.T.; SHEFFER, R.G. & SHORE, J.D. Binding of heparin to high molecular weight kininogen. **Biochemistry**, v. 28, p.1213-1221, 1989.
- BLUMENKRANTZ, N. & ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acid. **Anal. Biochem.**, Duluth, v. 54, p. 484-489, 1973
- BODE, V. & FRANZ, G. Physiological activity of new heparinoids derived from plant polysaccharides. **Arch. Pharm. (Weinheim)**, v. 324, p. 363-365, 1991.
- BOEVÉ, E. R.; CAO, L.C.; VERKOELLEN, C.F.; ROMIJN, J.C.; BRUIJN, W.C. & SCHRÖDER, F.H. Glycosaminoglycans and other sulphated polysaccharides in calcuogenesis of urinary stones. **World J. Urol.**, v. 12, p. 43-48, 1994.
- BOURIN, M.C. & LINDAHL, U. Glicosaminoglycans and the relation of blood coagulation. **Biochem. J.**, London, v. 289, p. 313-330, 1993.

- BREZOLIN, T. M.; SANDER, P. C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; RINAUDO, M. & GANTER, J. L. M. S. Binary polysaccharide gels interaction between xanthan and galactomannans from brazilian seeds. **Carbohydr. Polym.**, v. 33, p. 131-138, 1997.
- BREZOLIN, T. M. **Propriedades físico-químicas de biopolímeros: xantana, galactomananas**. Curitiba, 1998. Dissertação (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- BROWN, B. A. Hematology: Principles and procedure, 4th ed.. *In: Coagulation*, Philadelphia: Lea and Feliger, p.179, 1984.
- CALSTRÖM, A. S.; LIEDÉN, K. & BJÖRK, I. Decreased binding of heparin to antithrombin folowing the interaction between antithrombing and thrombin. **Thromb. Res.**, v. 11, p.785-797, 1977.
- CÀSSARO, C. M. F. & DIETRICH, C.P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **J. Biol. Chem.** v. 252, p. 2254-2261, 1977.
- CASTELLOT, J.; KARNOVSKY, M. J. & SPIELGELMAN, B. M. Differentiation dependent stimulation of neovascularization and endothelial cell chemotaxis by 3T3 adipocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.**, v. 79, p. 5597-5601, 1982.
- CASU, B.; ORESTE, P.; TORRI, G. ZOPPETTI, G. CHOAY, J.; LORMEAU, J-C.; PETITOU, M.; SINAÏ, P. The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. **Biochem. J.**, v. 197, p. 599-609, 1981.

- CECY, C. **Heterosídeos antraquinônicos em frutos de *Senna macranthera* (Colladon) var. *nervosa* (Vogel) Irwin & Barnaby**. Curitiba, 1993. Tese apresentada para o concurso de professor titular de farmacognosia - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
- CHANDRASEKARAN, R. Molecular architecture of polysaccharide helices in oriented fibers. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 52, p. 311-439, 1997.
- CHARLES, A. F. & SCOTT, D.A. Studies on heparin. **J. Biol. Chem.**, v.102, p. 431-435, 1933.
- CHOAY, J., PETITOU, M., LORMEAU, J.C., SINAÏ, P., CASU, B. & GATTI, G. Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.116, p.492-499, 1983.
- CHURCH, F.C., NOYES, C.M. & GRIFFITH, M.J. Inhibition of chymotrypsin by heparin cofactor II. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 82, p. 6431-6434, 1985.
- CIACCIA, A.V.; ANNEMIEKE, J.W. & CHURCH, F.C. Heparin promotes proteolytic inactivation by thrombin of a reactive site mutant (L444R) of recombinant heparin cofactor II. **J. Biol. Chem.** v. 272, n.2, p. 888-893, 1997.
- CIUCANU, I. & KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 131, p. 209-217, 1984.
- COLLEN, D.; SCHETZ, J. DeCOCK, F.; HOLMER, E. & VERSTRAETE, M. Metabolism of antithrombin III (heparin cofactor) in man: Effects of venous thrombosis and heparin administration. **Eur. J. Clin. Invest.** v. 7, p. 27-35, 1977.

- CONARD, J.; BROSSTAD, F.; LARSON, M. L.; SAMAMA, M. & ABILDGAARD, U.
Molar antithrombin concentration in normal human plasma. **Haemostasis**, v. 13, p. 363-368, 1983.
- COOMBE, D. R.; PARISH, C.R.; RAMSHAW, I. A. & SNOWDEN, J.M. Analysis of the inhibition of tumor metastasis by sulphated polysaccharides. **Int. J. Cancer**, v. 39, p. 82-86, 1987.
- CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plantes. New York: Columbia University, 1981.
- CURLING, J. The use of sephadex in the separation, purification and characterization of biological materials. **Exp. Physiol. Biochem.**, London, v.3, p. 417-484, 1970.
- DEA, I.C.M. Effect of galactose substitution-patterns on the interaction properties of galactomannans. **Carbohydr. Res.** Amsterdam, v. 57, p. 249-272, 1977.
- DEA, I.C.M. The role of structural modification in controlling polysaccharides funcionalality, *In*: Yalpani, M. **Industrial polysaccharides: Genetic Engenering. Structure / Property relations and applications**. Elsevier Science., Amsterdam, p. 202-216, 1987.
- DEA, I.C.M.; CLARK, A. H., McCEARLY, B. V. Effect os galactose. Substitution-patterns on the interaction properties of galactomannans. **Carbohydr. Res.** Amsterdam, v. 147, p. 175-194, 1986.
- DEA, I.C.M. & MORRISON, A. Chemistry and interaction of seeds galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem.**, San Diego, v.31, p. 241-312, 1975.

- DeCLERCQ, E. Basic approaches to antiretroviral therapy. **J. Acquir. Immun. Defic. Syndr.**, v. 4, p. 207-218, 1991.
- DEY, P.M. Biochemistry of plant galactomannan. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, San Diego, v. 35, p. 341-376, 1978.
- DIETRICH, C.P.; IVARNE, L. S.; TERSARIOL, B.; SILVA, R.B.; BIANCHINI, P & NADER, H. Dependence of the C-6 sulfate of the glucosamine moiety and 1→4 glycosidic linkage of heparin disaccharides for production of hemorrhage: reversal of the antihemostatic activity of heparin and their fragments by adenosine triphosphate and myosin. **Sem. Thrombosis hemostasis.**, v. 17, p. 65-73, 1991.
- DOCTOR, V.M.; LEWIS, D.; COLEMAN, M.; KEMP, M.T.; MARBLEY, E. & SAULS, V. Anticoagulant properties of semisynthetic polysaccharide sulfates. **Thromb. Res.**, v.64, p. 413-425, 1991.
- DOCTOR, V.M. & ESHO, D. Studies, by ^{13}C - n.m.r. and H^1 - n.m.r. spectroscopy of polysaccharides structure following sulfation. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 121, p. 312-315, 1983.
- DOGSON, K. S. & PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem. J.**, London, v. 84, p. 106-110, 1962.
- DOOLITTLE, R.F. Fibrinogen and fibrin. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 53, p. 195-229, 1984.
- DUBOIS, M; GILLES, K. A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P. A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem.**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.

- EVINGTON, J.R.; FELDMAN, P.A.; LUSCOMBE, M. & HOLBROOK, J.J. The catalysis by heparin of the reaction between thrombin and antithrombin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 870, p. 92-101, 1986.
- FERRARINI, M. & GROSSI, C. E. Definition of the cell types within the so called "null lymphocytes" population of human peripheral blood. An analysis of phenotypes and functions. **Sem. Hematol.**, v. 21, p. 270-286, 1984.
- FINOTTI, P & LAURETO, P. P. Differential effects of heparin and glucose on structural conformation of human α_1 antitrypsin: Evidence for a heparin-induced cleaved form of the inhibitor. **Arch. Biochem. Bioph.**, v. 347, n. 1, p. 19-29, 1997.
- FISCHBACH, D. P. & FOGDALL, R. P. *In: Coagulation*. Editora Médica Panamericana, Buenos Aires, p. 14-264, 1985.
- FOLKMAN, J., LANGER, R., LINHARDT, R. J., HAUDENSCHILD, C. & TAYLOR, S. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or an heparin fragment in the presence of cortisone. **Science**, v. 221, p. 719-725, 1983.
- FOSTER, A. B. & STACEY, M. The chemistry of the 2-amino sugars (2-amino-2-deoxy-sugars). **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 7, p. 247-288, 1952.
- GAILANI, D. & BROZE, G.J. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. **Science**, v. 253, p. 909-912, 1991.
- GANTER, J. L. M. S., ZAWADZKI-BAGGIO, S. F., LEITNER, S. C. S., SIERAKOWSKI, M.R. & REICHER, F. Structural studies on galactomannans from brazilian seeds. **J. Carbohydr. Chem.**, v. 12, n. 6, p. 753-767, 1993.

- GANTER, J. L. M. S., HEYRAUD, A., PETKOWICZ, C. L. O., RINAUDO, M & REICHER, F. Galactomannans from brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **Int. J. Macrobiol**, v. 17, n. 1, p. 13-19, 1994.
- GERBER, P.; DUTCHER, J.D.; ADAMS, E.V. & SHERMAN, J. H. Protective effect of seaweed extracts for chicken embryos infected with influenza B or mumps virus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Baltimore, v. 99, p. 590-593, 1958.
- GERMANO, S. **Heparinódes produzidos por modificação química de galactomananas de sementes de *Cassia fastuosa* (Willd) e *Mimosa scabrella* (Bentham).** Curitiba, 1996. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- GETTINS, P. Antithrombin III and its interaction with heparin. Comparison of the human, bovine and porcine proteins by ^1H n.m.r. spectroscopy. **Biochemistry.**, v. 26, p.1391-1398,1987.
- GOLDSTEIN, I.L.; HAY, G.W.; LEWIS, B.A. & SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 361-370, 1965.
- GORIN, P. A. & MAZUREK, M. Assignment of carbon-13 in nuclear magnetic resonance spectra of D-galactopyrano- α -D-mannopyranans from yeasts. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 105, p. 283-287, 1982.

- GORIN, P. A. J. & SPENCER, J. F. T. ^{13}C magnetic resonance and structural studies on the mannose-containing polysaccharides of some *Pichia* and *Hansenula* spp. **Can. J. Microbiol.**, v. 18, p. 1709-1715, 1972.
- GORIN, P. A. J. & SPENCER, J. F. T. Carbon - 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, San Diego, v. 38, p. 17-37, 1981.
- GORSKI, A.; WASIK, M. NOVACZYK, M. & KORCZAK-KOWALSKA, G. Immunomodulating activity of heparin. **Faseb J.**, v.5; p. 2287-2291, 1991.
- GOTTARDI, D. T.; MARTIN, S.; GANTER, J. L. M. S.; SIERAKOWSKI, M. R. New sources of galactomannans. **Anais do 2º SIAP, 4º SLAP, 6º I. M. C.** v. 2, p. 759-761, 1994.
- GRIFFITH, M. J. The heparin-enhanced antithrombin III/thrombin reaction is saturable with respect to both thrombin and antithrombin III. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 13899-13302, 1982.
- GRIFFITH, M. J. Heparin-catalysed inhibitor protease reactions: kinetic evidence for a common mechanism of action of heparin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 80, p. 5460-5465, 1983.
- GRIFFITH, M. J.; NOYES, C. M.; TYNDALL, J.A. & CHURCH, F. C. Structural evidence for leucine at the reactive site of heparin cofactor II. **Biochemistry**, v. 24, p. 6777-6782, 1985.

- GROOTENHUIS, P. D. J. & BOECKEL, C.A.A. Constructing a molecular model of the interaction between antithrombin III and a potent heparin analogue. **J. Am. Chem. Soc.**, v.113, p. 2743-2747, 1991.
- HAINES, A. W. Relative reactivities of hydroxyl groups carbohydrates. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v.33, p. 11-113, 1976.
- HANDIN, R.I. & COHEN, H.J. Purification and binding properties of human platelet factor four. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 4273-4282, 1976.
- HARRIS, P. J.; HENRY, R. J.; BLAKENEY, A. B. & STONE, B. A. Na improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polisaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 127, p. 59-73, 1984.
- HARRY, L. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do brasil. Nova Odessa, São Paulo: editora Plantarum, 1992.
- HARTREE, E. F. Determination of protein. A modification of Lowry method that gives a linear photometric reponse. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.
- HAYAISHI, M. & YAMADA, K. M. Divalent cation modulation of fibronectin binding to heparin and to DNA. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 5263-5267, 1982.
- HEMKER, H. C. & BÉGUIN, S.A. A rational approach to heparins. **Nouv. Ver. Fr. Hematol.**, v. 34, p. 5-6, 1992.
- HERBERMAN, R.B. Natural killer cells. **Ann. Ver. Med.**, v.37, p. 247-352, 1986.

- HOLODNIY, M.; KIM, S.; KATZENSTEIN, D.; KONRAD, M.; GROVES, E. & MERIGAN, T.C. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. **J. Clinical Microbiol.**, v. 29, n. 4, p. 676-679, 1991.
- HORNER, A. A. & YOUNG, E. A Symmetric distribution of sites with high affinity for antithrombin III in rat skin heparin proteoglycans. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 257, n. 15, p. 8749-8754, 1982
- HRÏNCOVINI, M. & TORRI, G. Dynamics in aqueous solutions of the pentasaccharide corresponding to the binding site of heparin for antithrombin III studied by NMR relaxion measurements. **Carbohydr. Res.**, Amsterdan, v. 268, p. 159-175, 1995.
- IRWIN, H. & BARNEBY, R. C. The American Cassinae. A Synoptical Revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassinae in the New World. **Mem. N York Bot. Gardem**, v. 35, p. 1-454, 1982.
- JACKSON, C.M. & NEMERSON, Y. Blood coagulation. **Ann. Rev. Biochem.** , v. 49, p. 765-811, 1980.
- JOHANN, S.; ZOLLER, C.; HAAS, S.; BLÜMEL, G.; LIPP, M. & FÖRSTER, R. Sulfated polysaccharide anticoagulants supress natural killer cell avtivity in vitro. **Thrombosis Haemost.**, v. 74, p. 998-1002, 1995.
- JORDAN, R. E.; BEELER, D. L. & ROSEMBERG, R. D. Fractionation of low molecular weight heparin species and their interaction with antithrombin. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 2909-29013, 1979.

- JORDAN, R. E.; FAVREAU, L.V.; BRASWELL, E.H. & ROSEMBERG, R.D. Heparin with two binding sites for antithrombin or platelet factor four. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 400-406, 1982.
- JORDAN, R. E.; OOSTA, G. M.; GARDNER, W. T. & ROSEMBERG, R. D. The kinetics of hemostatic enzyme antithrombin interactions in the presence of low molecular weight heparin. **J. Biol. Chem.** , v. 255, p. 10081-10090, 1980.
- JORPES, C. The chemistry of heparin. **Biochem. J.** , v. 29, p.1817-1830, 1935.
- KOOIMAN, P. The relation between monosaccharides composition and specific optical rotation of galactomannans from plant seeds. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 25, p. 1, 1971.
- KRIEDEL, S.J. & KNAUER, D. J. Lysine residue 114 in human antithrombin III is required for heparin pentasaccharide-mediated activation. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 7656-7660, n. 12, 1997.
- LAM, L.H.; SIBERT, J.E. & ROSEMBERG, R.D. The separation of active and inactive forms of heparin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 69, p. 570-577, 1976.
- LANE, D.A.; FLYNN, A.M.; PEJLER, G.; LINDAHL, U.; CHOAY, J. & PREISSNER, K. Structural requirements for the neutralization of heparin-like saccharides by complement S protein/vitronectin. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 16343-16348, 1987.
- LANG, P. MASCI, G.; FANUTTI, C. & REID, J. S.G. Tamarind seed polysaccharide: preparation, characterization and solution properties of carboxylated, sulphated and alkylaminated derivatives. **Carbohydr. Polym.** , Barking, v. 17, p. 185-198, 1992.

- LARM, O.; LARSSON, K.; SCHOLANDER, E. The preparation of a heparin analogue from alginic acid. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 73, p. 332-336, 1979.
- LAUDANO, A. P. & DOOLITTLE, R. F. Influence of calcium ion on the binding of fibrin amino terminal peptides to fibrinogen. **Science**, v. 212, p. 457-5-459, 1981.
- LAWRENCE, A. A., Natural gums for edible purposes. New Jersey, NOYES DATA Corporation, p. 36-43, 1976.
- LEON, M.; AICH, M.; COEZY, E.; GUENNEC, J.Y.; FIESSINGER, J.N. Antithrombin III synthesis in rat liver parenchymal cells. **Thrombin Res.** v. 30, p. 369-375, 1983.
- LESCHZINER, C. & CEREZO, A. S. Correlation of chemical composition and optical rotation of water-soluble galactomannans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 11, p. 113-118, 1969.
- LIJNEN, H.R., HOYLAERTS, M. & COLLEN, D. Heparin binding properties of human histidine-rich glycoprotein. Mechanism and role in the neutralization of heparin in plasma. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 3803-3808, 1983.
- LIMA, M. M. **Polissacarídeos nativos e modificados das sementes de *Hymenaea courbaril***. Curitiba, 1997. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- LINDAHL, U. L.; THUNBERG, G. BACKSTROM, J.; RIESENFELD, K.; NORDLING, I. & BJORK. Extension and structural variability of the antithrombin-binding sequence in heparin. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 12368-12376, 1984.

- LLOYD, A.G. & DODGSON, K. S. Infrared studies on sulphate esters II. Monosaccharides sulphates. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 46, p. 116-120, 1961
- LLOYD, A.G.; TUDBALL, N. & DODGSON, K. S. Infrared studies on sulphate esters III. O-sulphate esters of alcohols, amino alcohols and hydroxylated amino acids. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 52, p. 413-419, 1961
- MANN, K. G.; JENNY, R. J. & KRISHNASWANY, S. Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 57, p. 915-956, 1988.
- MATHESON, N.K. *In*: DEY, P. M. & HARBONE, J. B. **Methods in Plant Biochemistry**, London: Academic Press, v. 2 Mannose - based polysaccharides, p. 371-413, 1990.
- MATHEWS, M. B. *In* Connective tissue. Macromolecular structure and evolution, Berlin, Springer, p. 93-206, 1975.
- MCCLEARY, B.V. & NEUKON, H. Effect of enzymic modification on the solution and interaction properties of galactomannans. **Progr. Food. Nutr. Sci.**, Tarryton, v.6, p. 109-118, 1982.
- MORITA, T. & JACKSON, C.M. *In*. ed. J. W. Suttie, **Vitamin K metabolism and vitamin K dependent proteins**, p.120-123, 1979.
- MULLOY, B.; RIBEIRO, A. N.; ALVES, A. P.; VIEIRA, R. P. & MOURÃO, P.A.S. Sulfated fucans from equinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit

defined by specific patterns of sulfation at the O-2 and O-4 positions. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 22113-22123, 1994.

MURATA, J.; SAIKI, I.; NISHIMURA, S.; NISHI, N. , TOKURA, S. & AZUMA, I.
Inhibitory effect of chitin heparinoids on the lung metastasis of B16-BL6 melanoma. **Jpn. J. Cancer Res.**, v.80, p. 866-872, 1989.

NADER, H.B. & DIETRICH, C. P. Anticoagulant, antithrombotic and antihemostatic activities of heparin: structural requirements, mechanism of action and clinical applications. **Glycobiol. Res.**, v. 46, n.4,p. 297-302, 1994.

NADKARNI, V. D.; TOIDA, T, GORP, C.L.V.; SCHUBERT, R. L.; WEILER, J.M.;
HANSEN, K.P.; CALDWELL, E. E. O. & LINHARDT, R. J. Preparation and biological activity of N-sulfonated chondroitin and dermatan sulfated derivatives. **Carbohydr. Res.** ,v.290, p. 87-96, 1996.

NELSON, N. A. Photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. **J. Biol. Chem.**, v. 153, p. 375-380, 1944.

NISHINO, T.; YOKOYAMA, G.; DOBASHI, K.; FUJIHARA, M. & NAGUNO, T.
Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood anticoagulant activities. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 186, p. 119-129, 1989.

NISHINO, T. & NAGUNO, T. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. **Carbohydr. Res.**, v. 229, p. 355-362, 1992.

- NOBLE, O.; PEREZ, S.; ROCHAS, C. & TARAVEL, F. Optical rotation of branched polysaccharides. The galactomannan case. **Polymer Bull.**, [S.I.], v. 16, p. 175, 1986.
- NORDENMAN, B., & BJÖRK, I. . Binding of low-affinity and high affinity heparin to antithrombin. Ultraviolet difference spectroscopy and circular dichroism studies. **Biochemistry.**, v, 17, p.3339-3344, 1978.
- NORDENMAN, B. & BJÖRK, I. Studies on the binding of heparin to prothrombin and thrombin and the effect of the heparin binding on thrombin activity. **Thromb. Res.**, v. 12, p. 755-765, 1978.
- NORDENMAN, B., DANIELSSON, A., & BJÖRK, I. The binding of low-affinity and high affinity heparin to antithrombin. **Eur. J. Biochem.**, v. 90, p. 1-6, 1978.
- OLSON, S. T. & BJÖRK, I. Regulation of thrombin activity by antithrombin and heparin. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 20, n.4, 1994.
- OLSON, S. T. & SHORE, J. D. Demonstration of a two reaction mechanism for inhibition of α -thrombin by antithrombin III and identification of the step affected by heparin. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 14891-14895, 1982.
- OLSON, S. T. & SHORE, J. D. Transient kinetics of heparin-catalysed protease inactivation by antithrombin III. The reaction step limiting heparin turnover in thrombin neutralization. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 13151-13159, 1986.
- OLSON, S.T. & SHORE, J.D. Binding of high affinity to antithrombin III., **J. Biol. Chem.**, v.256, p.11065-11072, 1981.

- OLSON, S.T. & BJÖRK, I. Predominant contribution of surface approximation to the mechanism of heparin acceleration of the antithrombin/thrombin reaction. Elucidation for salt concentration effects. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 6353-6364, 1991.
- OLSON, S. T., BJÖRK, I., SHEFFER, R., CRAIG, P.A., SHORE, J.D. & CHOAY, J. Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.12528-12538, 1992.
- O'NEILL, A. N. Sulphated derivatives of Laminarin. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 33, p. 1097-1101, 1955.
- PARKER, K. A. & TOLLEFSEN, D. M. The protease specificity of heparin cofactor II. **J. Biol. Chem.** v. 260, p. 3501-3505, 1985.
- PAVÃO, M.S.G.; MOURÃO, P.A.S., MULLOY, B. & TOLLEFSEN, D.M. A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from Ascidian. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 52, p. 31027-31036, 1995.
- PETERSON, C.B.; MORGAN, W. T. & BLACKBURN, M.N. Histidine-rich glycoprotein modulation of the anticoagulant activity of heparin. Evidences for a mechanism involving competition with both antithrombin and thrombin for heparin binding. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 7567-7574, 1987.
- PETITOU, M.; LORMEAU, J-C.; PERLY, B.; BERTHAULT, P.; BOSSENEC, V.; SIÉ, P. & CHOAY, J. Is there a unique sequence in heparin for interaction with heparin cofactor II ? **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 263, n. 18, p. 8685-8693, 1988.

- PLETCHER, C. H. & NELSESTUEN, G. L. Two-substrate reaction model for heparin-catalysed bovine antithrombin/protease reaction. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 1086-1091, 1983.
- PREISSNER, K. T. & MUELLER-BERGHAUS, G. S. Protein modulates the heparin-catalysed inhibition of thrombin by antithrombin III. Evidence for a direct interaction of S protein with heparin. **Eur. J. Biochem.**, v. 156, p. 645-650, 1986.
- RAZI, N.; FEYZI, E.; BJÖRK, I.; NAGGI, A.; CASU, B. & LINDAHL, V. Structural and functional properties of heparin analogues obtained by chemical sulfation of *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharides. **Biochem. J.**, London, v. 309, p. 465-472, 1995.
- RECHIA, C. G. V. ; SIERAKOWSKI, M. R.; GANTER, J. L. M. S. & REICHER, F. Polysaccharides from the seeds of *Senna multijuga*. **Intern. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 17, p. 409-412, 1995.
- REINHOLD, V. N.; CARR, S. A.; GREEN, B. N.; PETITOU, M.; CHOAY, J. & SINAY, P. Structural characterization of sulfated glycosaminoglycans by fast atom bombardment mass spectrometry: application to heparin fragments prepared by chemical synthesis. **Carbohydr. Res.**, v. 161, p. 305-313, 1987.
- ROCHA, C. Etude de la transation Sol-Gel du Kappa - Carraghenane. These Cocteur
Détat es Sciences. Université Scientifique et Médicale, Grenoble, 1982.
- ROL, F. Locust bean gum. In: WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J.N. **Industrial gums**.
San Diego: Academic Press, 2 ed, v. 1 p. 323-326, 1973.

ROSEMBERG, R. D. *In* The molecular basis of blood diseases. p.534-574, Philadelphia, 1987.

SCULLY, M.F.; ELLIS, V.; SENO, N. & KAKKAR, V.V. Effect of oversulphated condroitin and dermatan sulphate upon thrombin and factor Xa inactivation by antithrombin III and heparin cofactor II. **Biochem. J.**, v. 254, p. 547-551, 1988.

SIÉ, P.; OFOSU, F. FERNADEZ, F.; BUCHNAN, M. R.; PETITOU, M. & BONEU, B. Respective role of antithrombin III and heparin cofactor I in the *in vitro* anticoagulant effects of heparin and various sulfated polysaccharides. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v. 64, p. 707-714, 1996.

SOMOGYI, M. A. New reagent for determination of sugars. **J. Biol. Chem.**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SPENCER, W. W. Preparation and properties of several polysaccharide sulphates. **Arch. Biochem. Biophys.**, Duluth, v. 95, p. 36-41, 1961.

STRYER, L. Bioquímica. Ed. Guanabara Koogan, p. 203, 1992.

STUELP, P. M. **Atividade anticoagulante de α - e β -glucanas extraídas do líquen *Ramalina celastri* modificadas quimicamente.** Curitiba, 1997. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

TAVARES, G. A. **Estrutura e propriedades físico-químicas da galactomanana de semente de *Cassia fastuosa* Willd.** Curitiba, 1994. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

- THUNBERG, L., BÄCKSTRÖM, G., & LINDHAL, U. Further characterization of the antithrombin-binding sequence in heparin. **Carbohydr. Res.**, v.100, p.393-410,1982.
- TOLEDO, O.M.S. & DIETRICH, C. P. Tissue specific distribution of sulfated mucopolysaccharides in mammals. **Biochem. Biophys. Acta.** v. 498, p. 114-122, 1977.
- TOLLEFSEN, D. M.; PESTKA, C.A. & MONAFO, W. J. Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. **J. Biol. Chem.**, v. 258, n.11, p. 6713-6716, 1983.
- TSIANG, M., JAIN, A. K. & GIBBS, C. S. Functional requirements for inhibition of thrombin by antithrombin III in the presence and absence of heparin. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n.18, p. 12024-12029, 1997.
- TYRREL, D. J.; ISHIHARA, M.; RAO, N.; HORNE, A.; KIEFER, M.; STAUBER, G.; LAM, L. H. & STACK, R. J. Structure and biological activities of a heparin-derived hexasaccharide with high affinity for basic fibroblast growth factor. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n.7, p.4684-4689, 1993.
- VOLPI, N. Dermatan sulfate from beef mucosa: structure, phsycological and biological properties of fractions prepared by chemical depolymerization and anion-exchange chromatography. **Carbohydr. Res.**, v. 255, p. 133-144, 1994.
- WEILER, J.M.; EDENS, R. E.; LINHARDT, R.J. & KAPELANSKI, D. P. Heparin and modified heparin inhibit complement activation in vivo. **J. Immun.**, v.148, n. 10, p. 3210-3215, 1992.

WOLFRON, M. L. & THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 2, p. 211-215, 1963.

YALPANI & STANDFORD, P. A. Comercial polysaccharides: recent trends and developments. *In:* YALPANI, M. **Industrial Polysaccharides:** genetic engeneering, structure/properties, relations and applications, Amsterdan: Elsevier, p. 311-335, 1987.

YOUNG, E.; PRINS, M.; LEVINE, M.N. & HIRSH, J. Heparin binding plasma proteins, an important mechanism for heparin resistance. **Thromb. Haemost.**, v. 67, p. 639-643, 1992.