

JULIANA CURI MARTINICHEN

**AÇÃO ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS
MODIFICADOS ATRAVÉS DE REAÇÕES DE
SULFATAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial à obtenção do título de Mestre
em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

CURITIBA

2001

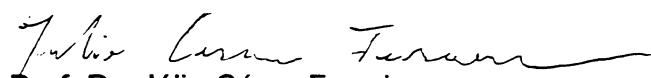
AÇÃO ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS MODIFICADOS ATRAVÉS DE REAÇÕES DE SULFATAÇÃO

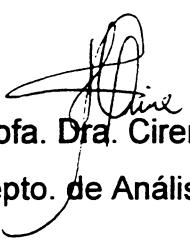
Juliana Curi Martinichen

Dissertação aprovada como requisito final para obtenção do título de mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:


Prof. Dr. Marcello Iacomini (Orientador)
Dept. de Bioquímica – UFPR


Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski
Dept. de Bioquímica – UFPR


Prof. Dr. Júlio César Ferreira
Dept. de Bioquímica – UFPR


Profa. Dra. Cirene Lesniowski Delgobo
Dept. de Análises Clínicas – UFSC

Curitiba, 15 de fevereiro de 2001.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Um homem sábio não procura oportunidades: as constrói.

Bacon

Aos meus pais Moacir e Tânia, por me proporcionarem condições para realizar meus ideais, pelo incentivo, carinho e amor.

Ao meu noivo Francisco pelo amor,
carinho, apoio, paciência, amizade,
incentivo, ajuda e compreensão em
todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela graça da vida e pela sua presença.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcello Iacomini, pela oportunidade, estímulo, confiança, dedicação e amizade.

Ao prof. Dr. Philip Albert James Gorin pelo apoio e amizade.

As professoras Dr.^a Maria Benigna Martinelli de Oliveira e Dr.^a Fany Reicher por lutarem pelos nossos interesses como alunos.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica.

Ao chefe do Departamento de Bioquímica Prof. Dr. Fábio Pedrosa.

Ao Dr. Giangiacomo Torri (Instituto Ronzoni, Itália) e ao César Augusto Tischer (Departamento de Bioquímica-UFPR), pelas análises de RMN ¹³C.

Ao Juan pelas análises de HPSEC-MALLS.

À Dr.^a Sandra W. Barreira, por ceder os polissacarídeos aqui estudados.

À Dr.^a Lismara Kafka Bomfim e ao pessoal do Setor de Hematologia do Hospital de Clínicas, por fornecer os plasmas humanos, sem isto seria impossível o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dr.^a Glaci T. Zancan, por sua luta pelo progresso da ciência.

Aos professores Dr.^a Maria Eugênia R. Duarte e Dr. Miguel Noseda, pela agradável convivência.

As bibliotecárias Telma, Izabella, Ruth e Mariza, pela colaboração e atenção.

A CAPES e PRONEX-Carboídratos, pelo apoio financeiro.

À Patrícia e à Elaine por me ensinarem algumas das técnicas utilizadas neste trabalho.

As minhas amigas Andréia M. Rocha, Lucimara, Cíntia, Caroline e Rosiane pelos momentos de descontração, conversas, amizade, apoio e incentivo.

Aos meus colegas e companheiros de laboratório Selene, Clarice, Guilherme, Patrícia, Elaine, Lucimara, Caroline, Cíntia, César e Rodrigo Reis pelo companheirismo e ajuda.

Aos alunos de iniciação científica Silvia, Marcele, Rodrigo e Elaine pela colaboração.

Aos meus irmãos Leonardo, Daniel e Alessandra pela compreensão e apoio.

Ao meu noivo Francisco por me estimular cada vez mais e me tranquilizar nos momentos difíceis. Você é muito especial.

Aos meus pais pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 LIQUENS	1
1.2 CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS LIQUENS	2
1.3 USO DOS LIQUENS E SEUS DERIVADOS	2
1.4 COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	5
1.5 HEPARINA	7
1.6 HEPARINÓIDES	13
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 REAÇÃO DE SULFATAÇÃO	20
3.2 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (D.S.).....	21
3.3 DETERMINAÇÃO DA HOMOGENEIDADE	21
3.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (RMN ^{13}C)	22
3.5 TESTES DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE	22
3.5.1 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (APTT)	23
3.5.2 Tempo de Trombina (TT)	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25

4.1 ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS DERIVATIZADOS	25
4.1.1 Determinação dos Graus de Substituição (D.S.)	25
4.1.2 Análise por RMN ^{13}C	27
4.1.2.1 Galactoglucomanana de <i>C. ibitipocae</i> nativa e sulfatada	27
4.1.2.2 Galactoglucomanana de <i>C. connexa</i> nativa e sulfatada	29
4.2 DETERMINAÇÃO DA HOMOGENEIDADE	31
4.2.1 Galactoglucomanana de <i>C. ibitipocae</i> Nativa e Sulfatada	31
4.2.2 Galactoglucomanana de <i>C. connexa</i> Nativa e Sulfatada	33
4.3 TESTES DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE <i>in vitro</i>	35
5 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CASCATA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	6
FIGURA 2 - SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DA HEPARINA QUE SE LIGA A AT III	9
FIGURA 3 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS GALACTOGLUCOMANANAS DE <i>C. ibitipocae</i> NATIVA, S1, S2, S3, S4 e S5	28
FIGURA 4 - ESPECTROS DE RMN ¹³ C DAS GALACTOGLUCOMANANAS DE <i>C. connexa</i> NATIVA, S1a, S2a, S3a, S4a e S5a	30
FIGURA 5 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DE <i>C. ibitipocae</i> E SEUS DERIVADOS SULFATADOS (S1 a S5) ATRAVÉS DE SEC-MALLS UTILIZANDO-SE DETECTORES DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO E ESPALHAMENTO DE LUZ	32
FIGURA 6 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DE <i>C. connexa</i> E SEUS DERIVADOS SULFATADOS (S1a a S5a) ATRAVÉS DE SEC-MALLS UTILIZANDO-SE DETECTORES DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO E ESPALHAMENTO DE LUZ	34
FIGURA 7 - RESULTADOS DOS TESTES APTT REALIZADOS COM A GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DA <i>C. ibitipocae</i> E SEUS DERIVADOS SULFATADOS	37
FIGURA 8 - RESULTADOS DOS TESTES TT REALIZADOS COM A GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DA <i>C. ibitipocae</i> E SEUS DERIVADOS SULFATADOS	38
FIGURA 9 - RESULTADOS DOS TESTES APTT REALIZADOS COM A GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DE <i>C. connexa</i> E SEUS DERIVADOS SULFATADOS	43
FIGURA 10 - RESULTADOS DOS TESTES TT REALIZADOS COM A GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DA <i>C. connexa</i> E SEUS DERIVADOS SULFATADOS.....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - GRAUS DE SUBSTITUIÇÃO (D.S.) E PORCENTAGEM DE ENXOFRE (%S) DOS DERIVADOS SULFATADOS DA GALACTOGLUCOMANANA DE <i>C. ibitipocae</i> e <i>C. connexa</i>	26
TABELA 2 - RELAÇÃO ENTRE O D.S. E A CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO MÍNIMA PARA TORNAR O PLASMA INCOAGULÁVEL DA GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DE <i>C. ibitipocae</i> E SEUS DERIVADOS SULFATADOS	36
TABELA 3 - RELAÇÃO ENTRE O D.S. E A POTÊNCIA ANTICOAGULANTE RELATIVA (PAR) DOS DERIVADOS SULFATADOS DA <i>C. ibitipocae</i> AVALIADOS PELOS TESTES APTT E TT	40
TABELA 4 - ANÁLISE POR METILAÇÃO DAS GALACTOGLUCOMANANAS DE <i>C. ibitipocae</i> e <i>C. connexa</i>	41
TABELA 5 - RELAÇÃO ENTRE O D.S. E A CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO MÍNIMA PARA TORNAR O PLASMA INCOAGULÁVEL DA GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DA <i>C. connexa</i> E SEUS DERIVADOS SULFATADOS.....	42
TABELA 6 - RELAÇÃO ENTRE O D.S. E A POTÊNCIA ANTICOAGULANTE RELATIVA (PAR) DOS DERIVADOS SULFATADOS DA <i>C. connexa</i> AVALIADOS PELOS TESTES APTT E TT	45

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

- % - Porcentagem
- δ - Deslocamento químico
- APTT - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado
- AT III - Antitrombina III
- CaCl_2 - Cloreto de Cálcio
- D.S. - Grau de Substituição
- D_2O - Óxido de Deutério (água deuterada)
- Da - Dalton
- FP4 - Fator Plaquetário 4
- GPC - Cromatografia de Gel Permeação
- HBMM - Heparina de Baixa Massa Molar
- HBMMs - Heparinas de Baixa Massa Molar
- HIV-1 - Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
- HPSEC - Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão
- Ig G - Imunoglobulina G
- IIa - Fator II ativado ou trombina
- IXa - Fator IX ativado
- KDa - Quilo Dalton
- M - Molar
- NaN_3 - Azida sódica
- NaNO_2 - Nitrito de sódio
- NO_2 - Dióxido de Nitrogênio
- ppm - Partes por milhão
- RMN ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
- S - Enxofre
- SEC-MALLS - Cromatografia de Exclusão Estérica Acoplada a Detector de Espalhamento de Luz a Laser com Multiângulos
- seg - Segundos
- SO_2 - Dióxido de Enxofre

TCA - Ácido Tricloroacético

TFPI - Inibidor do Fator Tissular

THI -Trombocitopenia Heparina Induzida

THI I - Trombocitopenia Heparina Induzida tipo I

THI II - Trombocitopenia Heparina Induzida tipo II

TMS - Tetrametilsilano

TT - Tempo de Trombina

Xa - Fator X ativado

XIa - Fator XI ativado

XIIa - Fator XII ativado

RESUMO

Duas galactoglucomanananas extraídas dos liquens *Cladonia ibitipocae* e *Cladonia connexa* apresentando uma relação molar de Gal:Glc:Man de 35:2:60 e 38:5:55, respectivamente, foram derivatizadas por sulfatação com a finalidade de tentar estabelecer a ação anticoagulante desses derivados. Com o objetivo de produzir moléculas com alto conteúdo em sulfato, foram realizadas cinco sulfatações seqüenciais para cada galactoglucomanana. Os derivados sulfatados de *C. ibitipocae* foram denominados de S1, S2, S3, S4 e S5 e os de *C. connexa* foram denominados de S1a, S2a, S3a, S4a e S5a, conforme o número de sulfatações ao qual foram submetidos e apresentaram os seguintes graus de substituição (D.S.): 0,20; 0,51; 0,87; 1,08; 1,29 e 0,24; 0,50; 0,98; 1,21; 1,54, respectivamente. Verificou-se que a substituição nas hidroxilas pelos grupos sulfato ocorre preferencialmente em C-6 em ambos os polímeros, conforme demonstrado por estudos de RMN ^{13}C , onde se observa o desaparecimento dos sinais de C-6 livre (δ 62-63 ppm) à medida que ocorre a sulfatação e surgimento de um sinal em torno de δ 69 ppm referente ao C-6 substituído. A análise realizada por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), demonstrou que os derivados sulfatados de ambas as galactoglucomanananas são heterogêneos e constituídos por uma família de galactoglucomanananas com massas molares diferenciadas. As análises de atividade anticoagulante foram realizadas através dos testes TT e APTT utilizando um pool de plasma humano normal, onde os resultados obtidos foram relacionados com os de uma heparina padrão (142 UI/mg). Os derivados sulfatados S5 (D.S. 1,29) da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* e S4a (D.S. 1,21) de *C. connexa* apresentaram uma ação anticoagulante máxima em uma concentração de 25 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de plasma para o teste APTT e TT, respectivamente.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 LIQUENS

Os liquens ao serem dissecados e analisados ao microscópio mostram-se formados por dois organismos diferentes: minúsculas algas e numerosos filamentos de fungos incolores denominados hifas. Estes organismos crescem juntos resultando na formação do talo liquênico que não possui semelhança com a alga ou com o fungo, quando cultivados separados (HALE, 1979).

O talo liquênico é constituído em sua maior parte pelas hifas do fungo e pelos filamentos da alga em menor proporção, apresenta-se com uma forma definida, a qual pode ser crustosa, foliosa ou fruticosa. O córtex do talo liquênico protege as células das algas de ressecamento e luz, enquanto que a medula facilita a troca gasosa (JOLY, 1975; AHMADJIAN e HALE, 1993).

De uma maneira geral, os liquens são constituídos por uma única espécie de fungo (micobionte) e de alga (fotobionte ou ficobionte). Entretanto, uma segunda espécie de alga pode ser observada em regiões do talo liquênico conhecidas por céfalódios. As espécies de fungos mais freqüentes observadas em liquens são, em ordem de freqüência, das classes: Ascomicetos, Basideomicetos e Deuteromicetos (CANAANI *et al.*, 1984).

Quanto aos ficobiontes, os elementos mais comuns são algas verdes do gênero *Trebouxia*, ou algas verde-azuladas pertencentes aos gêneros *Nostoc* e *Scytonema* (CANAANI *et al.*, 1984).

Os liquens foram inicialmente classificados como Criptógamos, ou seja, uma classe de vegetais inferiores, desprovidos de flores e com órgãos sexuais inaparentes, ao lado das algas, fungos, musgos e pteridófitas (HALE, 1979). Atualmente pertencem ao reino *Fungi* e a classe *Liquenes* (LINHARES e GEWANDSZAIDER, 1985). No entanto, esta classificação tem sido contestada por micologistas e liquenólogos, os quais preferem referir-se a estes organismos como fungos liquenizados, justificados pela predominância do micobionte dentro da associação simbiótica (BARINAGA, 1995).

Os liquens são principalmente epífitas, mas algumas espécies que se desenvolvem diretamente sobre o solo (JOLY, 1975), podem também ser encontrados em condições inóspitas, tais como rochas, regiões subárticas e em regiões polares além de troncos de árvores (GORIN *et al.*, 1993). A sua excepcional resistência a variações de temperatura, que pode abranger um intervalo de - 70 até 50°C, é uma característica inerente a esses organismos (XAVIER-FILHO e RIZZINI, 1976).

Devido à eliminação de certos ácidos orgânicos (ácidos liquênicos) os liquens são elementos importantes na desagregação de rochas (JOLY, 1975). As diferentes sensibilidades dos liquens ao SO₂, NO₂ e ozônio e sua habilidade para absorver e acumular metais pesados e radionuclídeos têm feito deles indicadores de poluição ao redor de centros urbanos e industriais (HALE, 1979; AHMADJIAN e HALE, 1993).

1.2 CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS LIQUENS

De acordo com a localização no talo, as substâncias produzidas pelos liquens são classificadas em: produtos intracelulares e extracelulares. Os produtos extracelulares são denominados metabólitos secundários, sendo encontrados na medula ou no córtex, raramente nas duas camadas. Constituem os ácidos alifáticos, meta e para-depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido pulvínico (HONDA e VILEGAS, 1998).

Os produtos intracelulares chamados de metabólitos primários estão ligados à parede celular e ao protoplasto entre eles podemos citar os carotenóides, aminoácidos, proteínas, glicolipídeos e carboidratos (HALE, 1983).

Os carboidratos de liquens são divididos em carboidratos de baixa e alta massa molar (GORIN *et al.*, 1993).

1.3 USO DOS LIQUENS E SEUS DERIVADOS

Um dos usos econômicos mais importantes dos liquens hoje é na indústria de perfumes. As espécies mais importantes para esta finalidade são a *Ervinia prunastri* e

Pseudovernia furfuracea que são misturadas com cascas de árvores e extraídas com solventes orgânicos, o extrato final purificado é usado como substância fixadora em alguns perfumes (ELIX, 1996).

O emprego medicinal de liquens sob a forma de extratos pelo homem é de longa data, desde 1700 a.c. há relatos sobre seu uso na medicina (XAVIER-FILHO e RIZZINI, 1976).

As espécies de *Lobaria pulmonaria* e *Cetraria islandica* foram empregadas como medicamento contra a tuberculose pulmonar a partir do século XV. *Usnea logissima* foi usada no passado como expectorante e cicatrizante e *Cladonia miniata* var. *sanguinea* foi usada contra “afta das crianças” (sapinho) (XAVIER-FILHO e RIZZINI, 1976).

O uso de liquens na sabedoria popular persiste até os dias atuais. Espécies de *Usnea* são utilizadas como expectorantes, *Cetraria islandica* é efetiva no tratamento de doenças pulmonares (ELIX, 1996).

BURKHOLDER em 1944, citado por ELIX (1996), descobriu que extratos de 52 espécies diferentes de liquens inibiam o crescimento de diversos tipos de bactérias. O efeito antibiótico encontrado para os metabólitos foi significante para bactérias Gram positivas e ineficiente para bactérias Gram negativas.

Ácidos úsnicos obtido de liquens exibem propriedades antivirais, espasmolíticas e antihistamínicas, bem como atividade contra bactérias Gram positivas. São usados comercialmente na forma de cremes antissépticos sendo mais eficientes que a penicilina no tratamento de feridas externas e queimaduras (ELIX, 1996).

Polissacarídeos obtidos de liquens, modificados quimicamente ou não, têm sido estudados quanto as suas propriedades biológicas tais como as atividades antitumoral, antiviral e anticoagulante.

Várias β -D-glucanas lineares isoladas de liquens foram estudadas para determinar suas atividades anti-tumorais (WHISTLER *et al.*, 1976), entretanto algumas dessas moléculas demonstraram ser insolúveis ou com pouca solubilidade em água, este fato prejudica seu uso como modificador da resposta biológica. Essa limitação é superada quando modificações químicas são realizadas introduzindo grupos funcionais polares (como o sulfato) com o propósito de aumentar sua reatividade e solubilidade

(NISHINO *et al.*, 1991a; NISHINO e NAGUMO, 1992; UEHARA *et al.*, 1992; NISHINO *et al.*, 1994).

Relatos indicam que estruturas com cadeia principal β -(1→3)-GlcP ramificadas ou não em O-6, apresentam a melhor atividade anti-tumoral. Essas moléculas são efetivas contra o sarcoma 180 e carcinoma de Erlich (BOHN e BeMULLER, 1995).

Os polissacarídeos isoliquenina e rafinose foram isolados do líquen *Usnea fasciata*; a isoliquenina demonstrou moderada atividade contra o sarcoma 180 e carcinoma de Erlich, porém quando associado a rafinose a atividade anti-tumoral foi de 90% de inibição (PEREIRA *et al.*, 1994).

Uma β -D-glucana (1→6) linear e uma galactomanana altamente ramificada cuja cadeia principal demonstrou ser constituída de unidades de D-manoze unidas por ligações do tipo α -(1→6) foram isoladas do líquen *Gyrophora esculenta*. A atividade antitumoral da galactomanana e da glucana foram testadas frente ao Sarcoma 180 e apresentaram 35,9% e 43,8% de inibição, respectivamente (SONE *et al.*, 1996).

α -D-glucanas possuem melhor solubilidade em água que as β -D-glucanas, podendo desta forma ser estudadas quanto à atividade antitumoral. Uma α -D-glucana contendo ligações (1→3) e (1→4) em uma razão molar 3:1 extraída do líquen *Ramalina celastri* e seu derivado sulfatado (D.S. 0,97) foram avaliados quanto a citotoxicidade *in vitro* crescendo-se células HeLa na presença ou ausência desses polissacarídeos separadamente e, quanto à atividade antitumoral *in vivo*, frente ao Sarcoma 180. Quanto à atividade citotóxica *in vitro* ambos os polissacarídeos causaram alterações morfológicas e sofrimento celular sobre células HeLa. Quanto à atividade antitumoral, a α -D-glucana na concentração 200 mg.Kg⁻¹ e a α -glucana sulfatada na concentração 20 mg. Kg⁻¹ causaram inibição do crescimento do tumor em 81 e 59%, respectivamente (CARNEIRO-LEÃO *et al.*, 1997; CARNEIRO-LEÃO, 1998).

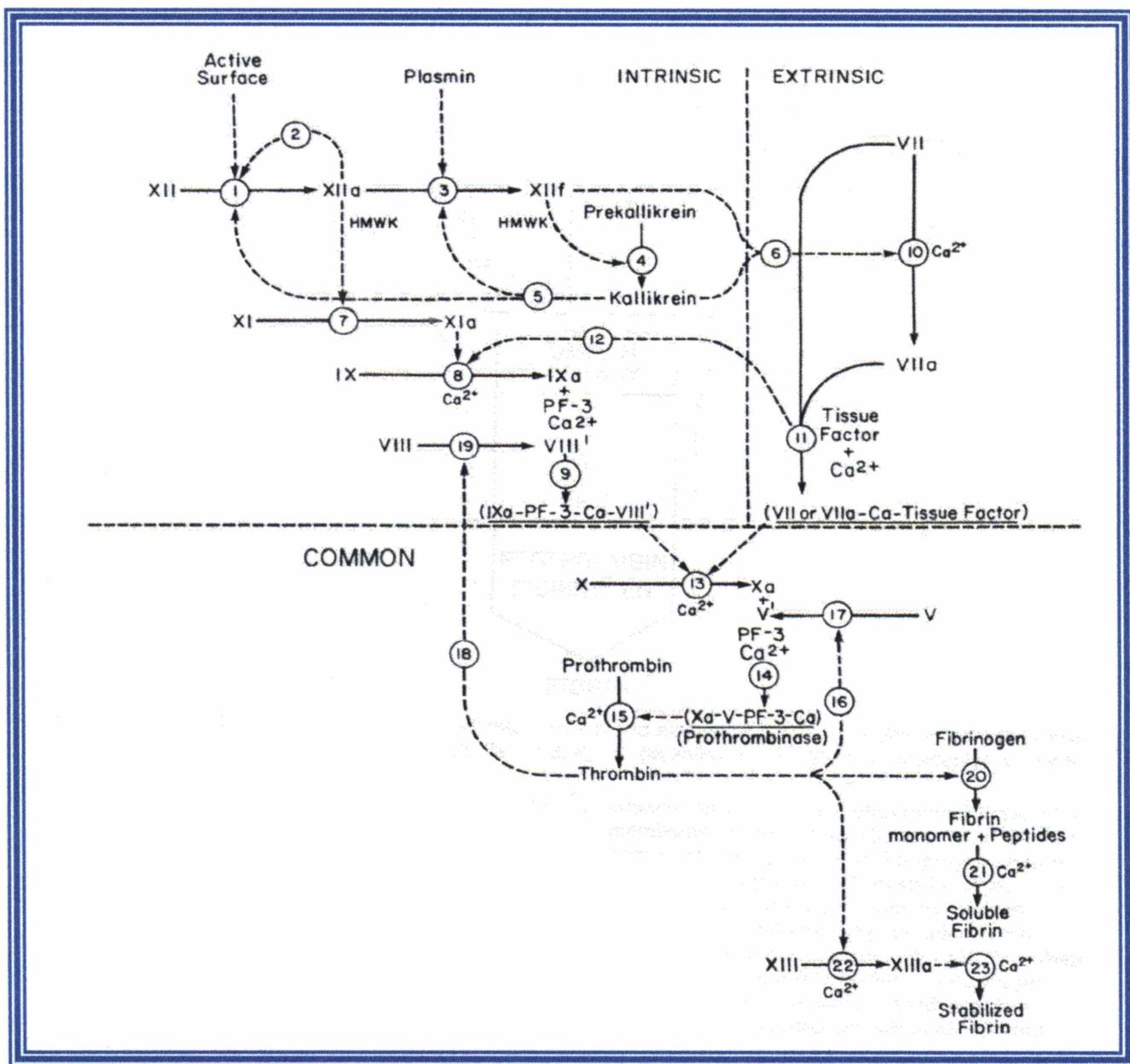
A presença de grupos sulfato nos polissacarídeos tem sido relacionada com a inibição da infectividade pelo vírus HIV-1 (MITSUYA *et al.*, 1988), com a inibição do desenvolvimento de lesões relacionadas ao Sarcoma de Kaposi (WELLSTEIN *et al.*, 1991; NAKAMURA *et al.*, 1992).

STUELP (1997) testou a atividade anticoagulante das α - e β -D-glucanas de *Ramalina celastri* nativas e após derivatizações químicas. Os derivados sulfatados e carboximetilados, com graus de sulfatações crescentes foram submetidos aos testes APTT (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado) e TT (Tempo de Trombina). Resultados promissores foram obtidos para os derivados sulfatados da α -D-glucana, os quais apresentaram atividade anticoagulante máxima em concentrações de 13 e 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma, para os testes APTT e TT, respectivamente.

1.4 COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

As substâncias que participam do processo da coagulação sanguínea são várias e denominadas de fatores da coagulação. As reações são de natureza enzimática, pois muitos desses fatores são pró-enzimas, sintetizadas independentemente. As pró-enzimas encontram-se no plasma sob a forma inativa, devendo ser ativadas para se transformarem em ativas durante o processo de coagulação. A ativação de cada fator faz-se em seqüência de fases em que cada enzima formada reage com seu substrato específico, convertendo-o em enzima ou fator ativo (LIMA *et al.*, 1992).

Em virtude desta seqüência de transformações pró-enzima-enzima, comparável a uma cascata foi denominada teoria da cascata (MacFARLANE, 1964) ou teoria da catarata (DAVIE e RATNOFF, 1964). Esquematicamente, a cascata da coagulação sanguínea está representada na Figura 1.



FONTE: LEE *et al.*, 1993.

FIGURA 1 - CASCATA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

1.5 HEPARINA

Um anticoagulante natural foi isolado de fígado e coração bovinos por McLEAN em 1916 o qual, foi denominado de heparina por HOWELL e HOLT (O'NEILL, 1955; MUELLER e SCHEIDT, 1994). A heparina tem sido usada na medicina por mais de 40 anos como agente anticoagulante, antitrombótico e antilipêmico (JAQUES, 1980). Comercialmente é preparada a partir de intestino de porco ou de boi e pulmão, fígado ou coração bovinos (HORNER e YONG, 1982; REINHOLD *et al.*, 1987; BOURIN e LINDAHL, 1993). Considerada um mucopolissacarídeo (glicosaminoglicana) aniónico sulfatado complexo, é produzida e estocada em mastócitos e basófilos e é constituída por uma mistura de compostos de massa molar altamente variável, entre 3 e 30 KDa com média em torno de 15 KDa, que corresponde a uma cadeia com 50 monossacarídeos, aproximadamente (HIRSH, 1985; HIRSH e FUSTER, 1994; VANDERMEULEN *et al.*, 1994; EDENS *et al.*, 1995).

A grande heterogeneidade de comprimento das cadeias dos polissacarídeos formadores da heparina pode ter uma importante função nas suas propriedades antitrombóticas e hemorrágicas (HIRSH, 1985).

Segundo NADER e DIETRICH (1994), moléculas de heparina com massa molar de no mínimo 12 KDa apresentam significante atividade anticoagulante, e moléculas com massa molar abaixo de 12 KDa apresentam redução na atividade anticoagulante. Deste modo, é necessário que a heparina possua uma massa molar mínima para apresentar atividade anticoagulante (NADER e DIETRICH, 1994).

A heparina contém unidades de ácido α -L-idopiranosilurônico ligados por ligação (1→4), unidades 2-amino-2-deoxi- α -D-glucopiranosil e uma pequena proporção de unidades de ácido β -D-glucopiranosilurônico. A hexosamina e as unidades de ácido urônico são ligados alternadamente para formar o polímero. As unidades são parcialmente O-sulfatadas, e a maioria das unidades 2-amino-2-deoxi- α -D-glucopiranosil são N-sulfatadas, sendo as restantes 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; RAZI *et al.*, 1995).

Estudos têm demonstrado que compostos como a heparina estão presentes em alguns invertebrados (CÁSSARO e DIETRICH, 1977; DIETRICH *et al.*, 1999).

A heparina interage com uma variedade de proteínas com amplo espectro de afinidade e especificidade (CASU, 1985; EDENS, 1995). Essas interações resultam em uma modificação da atividade da proteína, devido à inibição ou ao aumento de sua atividade (EDENS, 1995). Entre estas proteínas estão a vitronectina e glicoproteínas ricas em histidina (DAWES, 1993).

BRINKHOUS *et al.* (1939), demonstraram que a heparina requer um cofator no plasma para sua ação anticoagulante e ABILDGARD (1968) denominou esse cofator de Antitrombina III (ATIII).

A antitrombina III é um polipeptídeo glicosilado de cadeia única, com massa molar de cerca de 58 KDa, é capaz de inibir a trombina (IIa), os fatores Xa, IXa, XIa, XIIa e o complexo fator VII/fator tecidual (MAJERUS *et al.*, 1991; AUSTIN *et al.*, 1992; BOURIN e LINDHAL, 1993; LAWSON *et al.*, 1993).

O mecanismo de ação da heparina, acelerando a inibição da trombina pela AT III (JORDAN *et al.*, 1980), foi descrito como sendo mediado por dois processos: a) a formação de um complexo binário entre a ATIII e a heparina induz uma mudança de conformação na AT III que aumenta a associação com a trombina; b) 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). Este processo de inibição ocorre através da formação de um complexo covalente equimolar estável entre o centro ativo da AT III que contém uma arginina (Arg-393) e a serina do sítio ativo da trombina (BJÖRK e LINDHAL, 1982).

A heparina atua como catalisador na reação da ATIII com enzimas alvo. Uma única molécula de polissacarídeo é suficiente para acelerar a formação do complexo entre várias moléculas de ATIII e proteinases (JORDAN *et al.*, 1980; PLETCHER e NELSESTUEN, 1983; EVINGTON *et al.*, 1986).

A dissociação da heparina do complexo ternário heparina-ATIII-proteinase ocorre uma vez que um complexo estável entre o inibidor e a enzima tenha sido formado (JORDAN *et al.*, 1980; OLSON e SHORE, 1986).

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

A atividade anticoagulante da heparina é atribuída ao seu padrão complexo de substituintes sulfato e carboxil, os quais deixam este polímero com uma incomum alta densidade de carga. Estudos com heparinas modificadas e vários oligossacarídeos obtidos da mesma ou sintetizados indicaram que, cada uma dessas cargas negativas é significante para assegurar uma alta expressão da atividade anticoagulante (REJ *et al.*, 1991; HIRATA *et al.*, 1994).

O sítio de ligação da heparina à antitrombina III (Figura 2) é uma seqüência pentassacarídica específica (LINDHAL *et al.*, 1984; CASU, 1985; MAJERUS *et al.*, 1991; BRODY, 1997) que contém uma unidade de glucosamina 3-O-sulfatada, que se liga a um sítio rico em lisina na AT III (BRODY, 1997) a qual está presente em aproximadamente um terço das cadeias nas heparinas comerciais (RAZI *et al.*, 1995).

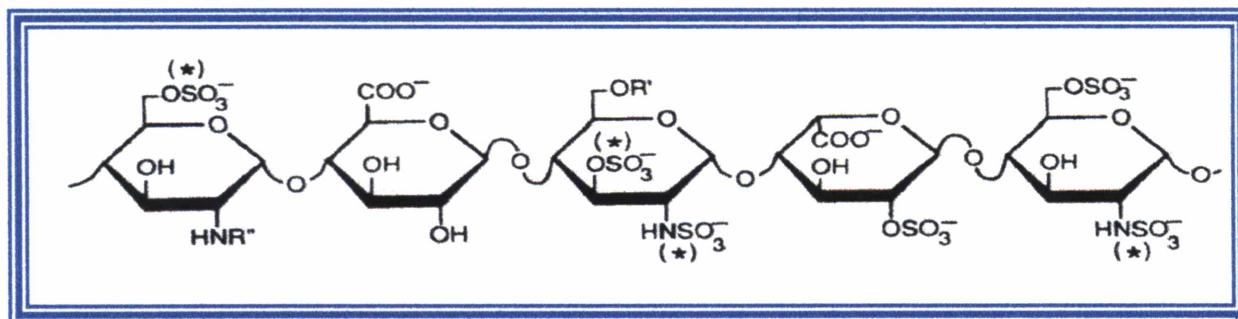


FIGURA 2 - SEQÜÊNCIA PENTASSACARÍDICA DA HEPARINA QUE SE LIGA A AT III. R'(-H ou SO₃) e R''(-SO₃ ou -COCH₃). Os grupos sulfato marcados com asterisco são considerados essenciais para a ligação com a AT III.

FONTE: LINDHAL *et al.*, 1984.

Heparinas supersulfatadas apresentam diminuição significativa de sua atividade anticoagulante quando comparadas com heparinas padrão. Este efeito se deve a provável ocorrência de sulfatação artificial junto com posições naturalmente sulfatadas no polissacarídeo, isto sugere que a atividade anticoagulante da heparina, via ATIII, não depende somente de seu conteúdo em sulfato, mas também da posição desses grupos na molécula (UCHIYAMA *et al.*, 1990).

Moléculas de heparina de baixa massa molar (com menos de dezoito unidades monossacarídicas) não podem se ligar à trombina e AT III simultaneamente, portanto não conseguem aumentar a taxa de reação de inibição da trombina pela AT III, neste caso o efeito anticoagulante é produzido, principalmente, através da inibição do fator Xa pela AT III (MAJERUS *et al.*, 1991).

A heparina também catalisa a inibição da trombina através da heparina cofator II, o qual inibe apenas a trombina (TOLLEFSEN *et al.*, 1982), este cofator é o principal responsável pela atividade antitrombótica da heparina (DOCTOR *et al.*, 1991). O efeito da heparina em inibir a trombina pela heparina cofator II parece ser devido ao conteúdo de carga total do polímero (BOURIN e LINDAHL, 1993) sem requerimento de qualquer seqüência oligossacarídica específica (GRIFFITH, 1983; PETITOU *et al.*, 1988).

A heparina inibe a alça de amplificação pela qual a trombina ativa os fatores V e VIII e, provavelmente, o fator XI (SAMANA *et al.*, 1996). Há, também, relatos que a heparina inibe a ativação do fator VII *in vitro* durante a coagulação sanguínea (GEROTZIAFAS *et al.*, 1996). A heparina ainda promove a liberação do inibidor do fator tissular (TFPI) do endotélio, que exerce sua função por inibição do complexo fator VIIa-fator tissular e por inibição da atividade catalítica do fator Xa (BROZE *et al.*, 1988; WARN-CRAMER *et al.*, 1988; SAMANA *et al.*, 1996).

Devido à heparina inibir vários passos na cascata da coagulação, ela prolonga vários testes de coagulação, os quais são usados para medir seu efeito anticoagulante (GALLUS e HIRSH, 1976).

Muitas proteínas plasmáticas ou liberadas pelas plaquetas ligam-se à heparina atuando como agonistas do seu efeito estimulador nas reações entre AT III e proteinases. Dentre essas proteínas estão glicoproteínas ricas em histidina

(PETERSON *et al.*, 1987), fator plaquetário 4 (JORDAN *et al.*, 1982), proteína S ou vitronectina (PREISSNER e MUELLER-BERGAUS, 1986; LANE *et al.*, 1987), fibronectina (HAYASHI e YAMADA, 1982) e cininogênio de alta massa molar (BJÖRK *et al.*, 1989).

A partir dos anos 80, heparinas de baixa massa molar (HBMM) têm sido produzidas (BIJSTERVELD *et al.*, 1999), por depolimerização química ou enzimática de heparinas não fracionadas (COSMI e HIRSH, 1994). Dependendo da preparação, as HBMMs apresentam massa molar entre 2000 a 10.000 Da, com média em torno de 4000 a 6000 Da (SAMANA *et al.*, 1996). O uso de heparinas de baixa massa molar (HMMs) tem sido amplamente investigado como substituto na terapia com heparinas não fracionadas em pacientes com doenças trombóticas venosas e arteriais (BIJSTERVELD *et al.*, 1999). As HBMMs com massa molar menor que 5400 Da possuem principalmente atividade anti fator Xa enquanto que as moléculas com massa molar maior que 5400 Da inibem ambos fatores, Xa e trombina. As HBMMs são menos heterogêneas quanto à massa molar que as heparinas não fracionadas mas, em contraste são mais heterogêneas em termos de atividade biológica (SAMANA *et al.*, 1996).

Heparinas de baixa massa molar apresentam várias vantagens quando comparadas com heparinas não fracionadas: sua administração é subcutânea em doses fixas de acordo com o peso do paciente e, demonstra equivalente eficácia, quando comparada com doses ajustadas de heparina; apresenta melhor biodisponibilidade em baixas doses e maior tempo de meia-vida que heparinas não fracionadas; pode ser administrada de uma a duas vezes ao dia sem a necessidade de monitoramento laboratorial; tem baixa interação com plaquetas e pacientes que fazem o uso de HBMM apresentam menor risco de apresentar sangramento e trombocitopenia (COSMI e HIRSH, 1994; MacFARLANE e MEART, 1995; BIJSTERVELD *et al.*, 1999; GREEN, 1999). HBMM exibem mínima ligação com proteínas plasmáticas, células endoteliais e fator plaquetário 4 (MacFARLANE e MEART, 1995). Os efeitos indesejados comumente causados pelo uso da heparina, tais como sangramento, trombocitopenia, osteoporose, eosinofilia, reações de pele, reações alérgicas, alopecia,

transaminasemia, hipercalemia, hipoaldosteronismo e priapismo são menos freqüentes com o uso de heparinas de baixa massa molar (BICK e FRENKEL, 1999).

Os efeitos adversos mais comumente observados com o uso da heparina são a trombocitopenia, hemorragia e osteoporose. A trombocitopenia heparina-induzida (THI) é classificada em dois tipos distintos THI I e THI II. A THI I é uma trombocitopenia amena e assintomática, passageira, não imune, geralmente sem consequências clínicas adversas que ocorre em aproximadamente 25% dos pacientes dentro dos cinco primeiros dias do início do tratamento. A THI II é uma síndrome severa de trombocitopenia e trombose, que ocorre de 6 a 14 dias após o início da terapia, em aproximadamente 2% dos pacientes, está associada à morbidade e mortalidade e tem origem imunológica. O fator plaquetário 4 (FP4) liga-se a molécula de heparina para formar um complexo imunogênico, o imunocomplexo Ig G anti-heparina/FP4 ativa plaquetas provocando uma lesão endotelial imunológica com trombocitopenia e/ou trombose (BENTON e GERSH, 1998; WARKENTIN *et al.*, 1999; FABRIS *et al.*, 2000).

Tem sido relatado que as heparinas apresentam efeitos no metabolismo ósseo, mas o exato mecanismo pelo qual as heparinas produzem osteoporose ainda não é claro. As heparinas demonstram inibir a síntese do colágeno em culturas de órgãos, mas também demonstram estimular a síntese do coiágeno em culturas de osteoblastos (SAMANA *et al.*, 1996).

Além de seus efeitos antitrombóticos e anticoagulantes a heparina possui outros efeitos biológicos. Esses efeitos incluem interações com fatores de crescimento de células endoteliais; inibição da proliferação de células do músculo liso; ativação de lipoproteína lipase; supressão da secreção de aldosterona; indução da agregação de plaquetas (SHING *et al.*, 1984; BENGTSON-OLIVECRONA e OLIVECRONA, 1985; ROSEMBERG e BAUER, 1994); inibição de metástases de células tumorais (TYRREL *et al.*, 1995); interação com componentes do sistema complemento (WEILER *et al.*, 1992); atividade antihemostática, antihemolítica e antilipêmica e atividade inibitória de algumas enzimas como hialuronidase, helastase e α_1 antitripsina (DIETRICH *et al.*, 1991; NADER e DIETRICH, 1994; FINOTTI e LAURETO, 1997).

A atividade anticoagulante protagonizada pela heparina depende de diversos efeitos moleculares incluindo, o grau de sulfatação, distribuição dos grupos sulfato, massa molar e conformação da molécula (SCULLY e KAKKAR, 1984).

A heparina tem sido usada como droga de escolha na clínica, na profilaxia de eventos trombóticos pré- e pós-cirúrgicos (LINHARDT e TOIDA, 1997), contudo devido a seus efeitos indesejados, tais como episódios de sangramento, trombocitopenia heparina-induzida (SILVER *et al.*, 1983; KELTON, 1986) e, em longo prazo, osteoporose (GRIFFITH, *et al.*, 1965), além de outras desvantagens como, risco de contaminação com agentes patológicos provenientes dos órgãos utilizados para se obter a heparina (MOURÃO, 1998) entre outros já citados, o desenvolvimento de novos agentes anticoagulantes, que possam substituí-la, tem sido efetuado.

1.6 HEPARINÓIDES

Heparinóides ou análogos da heparina incluem polissacarídeos naturalmente sulfatados de origem vegetal ou animal, derivados sintéticos de polissacarídeos preparados por sulfatação de polissacarídeos neutros, e oligossacarídeos acídicos e seus pequenos análogos sintéticos (HOFFMAN *et al.*, 1982; SCULLY e KAKKAR, 1984; GUNAY e LINHARDT, 1999).

Em decorrência dos efeitos colaterais apresentados pela heparina, vários estudos têm sido realizados com heparinóides. Várias tentativas para produzir polissacarídeos modificados quimicamente que mimetizam as propriedades anticoagulantes da heparina têm sido feitas (CASU, 1985; RAZI *et al.*, 1995; GERMANO, 1996; STUELPEL, 1997; SOUZA-LIMA, 1997; MARTIN, 1999). A grande parte dessas tentativas apresentam pouco sucesso, devido à dificuldade de estimular a AT III de maneira correta (RAZI *et al.*, 1995).

As atividades anticoagulantes e antitrombóticas estão entre as propriedades mais amplamente estudadas em polissacarídeos sulfatados (MOURÃO *et al.*, 1996), além das propriedades antivirais e antitumorais.

Dentre os polissacarídeos sulfatados naturalmente com atividade biológica destacam-se várias fucanas. Entre os polissacarídeos de origem não mamífera, que exibem atividade biológica em mamíferos, os mais amplamente estudados são as fucanas naturalmente sulfatadas, isoladas de algas marrons (NISHINO *et al.*, 1991a; NISHINO e NAGUMO, 1992; MULLOY *et al.*, 1994).

Fucoidana é um polissacarídeo extraído de algas marinhas marrons, que possui atividade anticoagulante e antitrombótica (SPRINGER *et al.*, 1957; BOISSON-VIDAL *et al.*, 1991; MAURAY *et al.*, 1995); é composta de unidades de L-fucose em ligação α -(1→2) ou α -(1→3)-4-O-sulfatada com ramificações de unidades de D-xilose, D-galactose, ácido D-glucurônico ou sulfato nas posições 3 ou 2, possui alta massa molar e é altamente sulfatada (PATANKAR *et al.*, 1993). A atividade anticoagulante depende da massa molar e da composição química da fucoidana, particularmente dos conteúdos de fucose e sulfato (GRAUFFEL *et al.*, 1989; NISHINO *et al.*, 1991a). Este polissacarídeo catalisa a inibição da trombina pela AT III e, principalmente, pela heparina cofator II (CHURCH *et al.*, 1989; NISHINO *et al.*, 1991b; COLLIEC *et al.*, 1991; MAURAY *et al.*, 1995).

Fucoidanas típicas compostas por alto conteúdo de fucose e sulfato e baixo conteúdo de ácido urônico e outros açúcares neutros, possuem uma potente atividade anticoagulante; fucoidanas com grande quantidade de ácido urônico e outros açúcares neutros além da fucose e pouca quantidade de sulfato, possuem baixa atividade anticoagulante (NISHINO *et al.*, 1994).

NISHINO e NAGUMO (1992), em estudo comparativo com fucanas naturalmente sulfatadas, demonstraram que a atividade anticoagulante apresentada pelas mesmas depende não só do conteúdo em sulfato mas, também, da sua conformação e massa molar.

PEREIRA *et al.* (1999) compararam a atividade anticoagulante de fucanas sulfatadas provenientes de equinodermos com fucanas sulfatadas de algas marinhas marrons. As fucanas sulfatadas dos equinodermos estudados (*Lytechinus variegatus*, *Arbacia lixula* e *Ludwigothurea grisea*) apresentaram estruturas simples, compostas por unidades repetidas de oligossacarídeos, com diferentes padrões de sulfatação, já as

fucanas sulfatadas provenientes das algas marrons *Fucus versiculosos*, *Laminaria brasiliensis* e *Ascophyllum nodosum* demonstraram ser moléculas complexas, heterogêneas, ramificadas e com diferentes padrões de sulfatação. Os resultados obtidos quanto à atividade anticoagulante demonstraram que os diferentes aspectos estruturais determinam não apenas o potencial anticoagulante das fucanas sulfatadas, mas também o mecanismo pelo qual essas moléculas exercem sua atividade. As fucanas ramificadas de algas marrons inibiram diretamente a trombina enquanto que as fucanas de equinodermos requerem a presença de antitrombina ou heparina cofator II para inibir a trombina (PEREIRA *et al.*, 1999).

Em estudos realizados com fucanas de baixa massa molar obtida por hidrólise parcial ou depolimerização de fucoidanas extraídas da alga marinha marrom *Ascophyllum nodosum* ficou demonstrado que as unidades de fucose estavam sulfatadas principalmente em O-2, em menor extensão em O-3 e em menor extensão ainda em O-4 e em O-2,3. A atividade anticoagulante destas fucanas dependeu não apenas da massa molar e conteúdo de sulfato, como dos níveis de 2-O-sulfato e 2,3-di-O-sulfato nas moléculas (CHEVOLOT *et al.*, 1999).

Uma xilofucoglucuronana sulfatada extraída da alga *Spatoglossum schroei* demonstrou possuir baixa atividade anticoagulante, nenhuma atividade hemorrágica e alta atividade na estimulação da síntese de heparan sulfato de células vasculares endoteliais em cultura (LEITE *et al.*, 1998). Uma arabinana e uma arabinogalactana sulfatadas provenientes da alga marinha verde *Codium dwarkense* exibiram atividade anticoagulante, sendo que a arabinana sulfatada exibiu maior atividade anticoagulante que a arabinogalactana (SIDDHANTA *et al.*, 1999). Um outro polissacarídeo sulfatado extraído de folhas de *Artemisia princeps*, demonstrou aumentar a reação entre a heparina cofator II e a trombina mais que 6000 vezes, sendo que este efeito foi abolido pelo tratamento com condroitinase AC I, heparinase ou heparitinase, enquanto que, condroitinase ABC ou condroitinase AC II não produziu nenhum efeito (HAYAKAWA *et al.*, 1995).

UEHARA *et al.* (1992) isolaram uma ramnana sulfatada obtida através da extração em água quente da alga *Monostroma nitidum* e esta apresentou uma atividade

anticoagulante cerca de sete vezes maior que a apresentada pela heparina (UEHARA *et al.*, 1992).

Um condroitin sulfato fucosilado, extraído do pepino do mar *Ludwigothurea grisea*, exibiu potente ação anticoagulante devido à sua habilidade em potencializar a inibição da trombina através da heparina cofator II e antitrombina III. Comparações realizadas entre o polissacarídeo nativo e os quimicamente modificados (desulfatado, parcialmente defucosilado e carboxi-reduzido) sugeriram que as ramificações de fucose sulfatadas foram responsáveis por sua alta atividade anticoagulante (MOURÃO *et al.*, 1996). Esta mesma molécula e seus derivados modificados quimicamente foram testados em experimentos de estase trombótica em ratos para avaliar suas propriedades antitrombóticas. Os resultados obtidos demonstram que o polissacarídeo nativo reduz a trombose de uma maneira dose dependente em 10 minutos após a estase na dose de 1,5 mg/Kg (60 UI/Kg). Os polissacarídeos parcialmente defucosilados e desulfatados aboliram completamente a ação anticoagulante e antitrombótica (MOURÃO *et al.*, 1998).

Entre os polissacarídeos modificados por sulfatação química destacam-se as glucanas, as arabinogalactanas e as galactomananas (BODE e FRANZ, 1991).

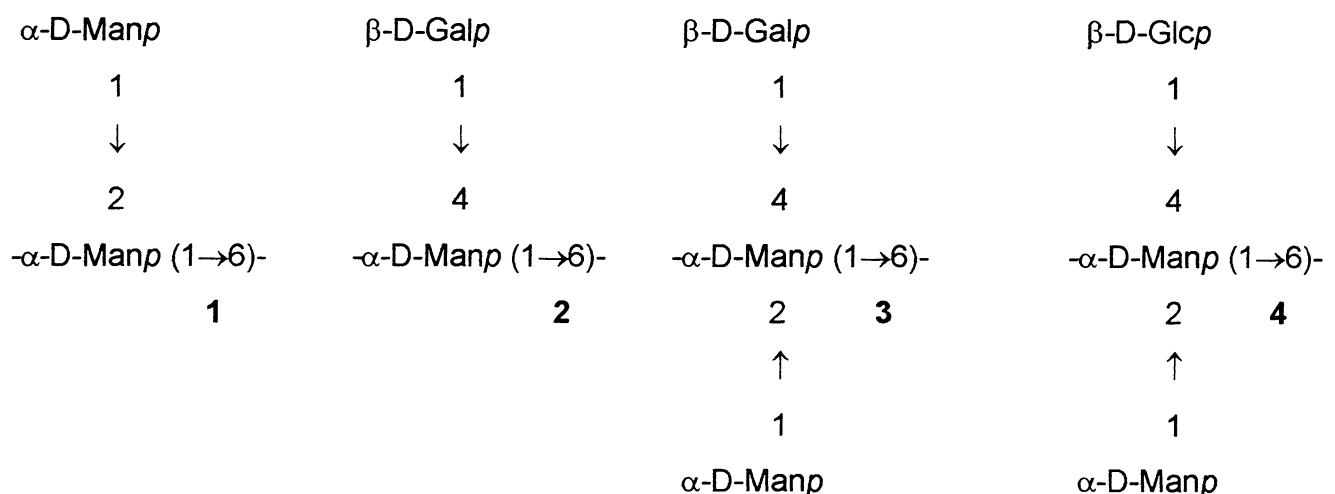
TAVARES, GERMANO, SOUZA-LIMA, PIRES e MARTIN, estudando galactomananas extraídas de sementes de *Cassia fastuosa*, de *Mimosa scabrella* e *Senna macranthera* e galactoxiloglucana de *Hymenaea courbaril*, mostraram que estes polissacarídeos exibem atividade anticoagulante similar à encontrada para a heparina padrão, quando sulfatados quimicamente (TAVARES, 1995; GERMANO, 1996; SOUZA-LIMA, 1997; PIRES, 1997; MARTIN, 1999).

Galactoglucomanana de *Cladonia ibitipocae*

BARREIRA (1999) estudou polissacarídeos e oligossacarídeos de liquens. Dentre os polissacarídeos foi isolado uma galactoglucomanana do líquen *Cladonia*

ibitipocae através da precipitação com solução de Fehling. A galactoglucomanana demonstrou uma proporção molar de manose, galactose e glucose de 60:35:2 e massa molar (Mw) igual a $2,0 \times 10^6$ Da, que foi determinada através de eluição em coluna de Sepharose CL-4B (BARREIRA, 1999).

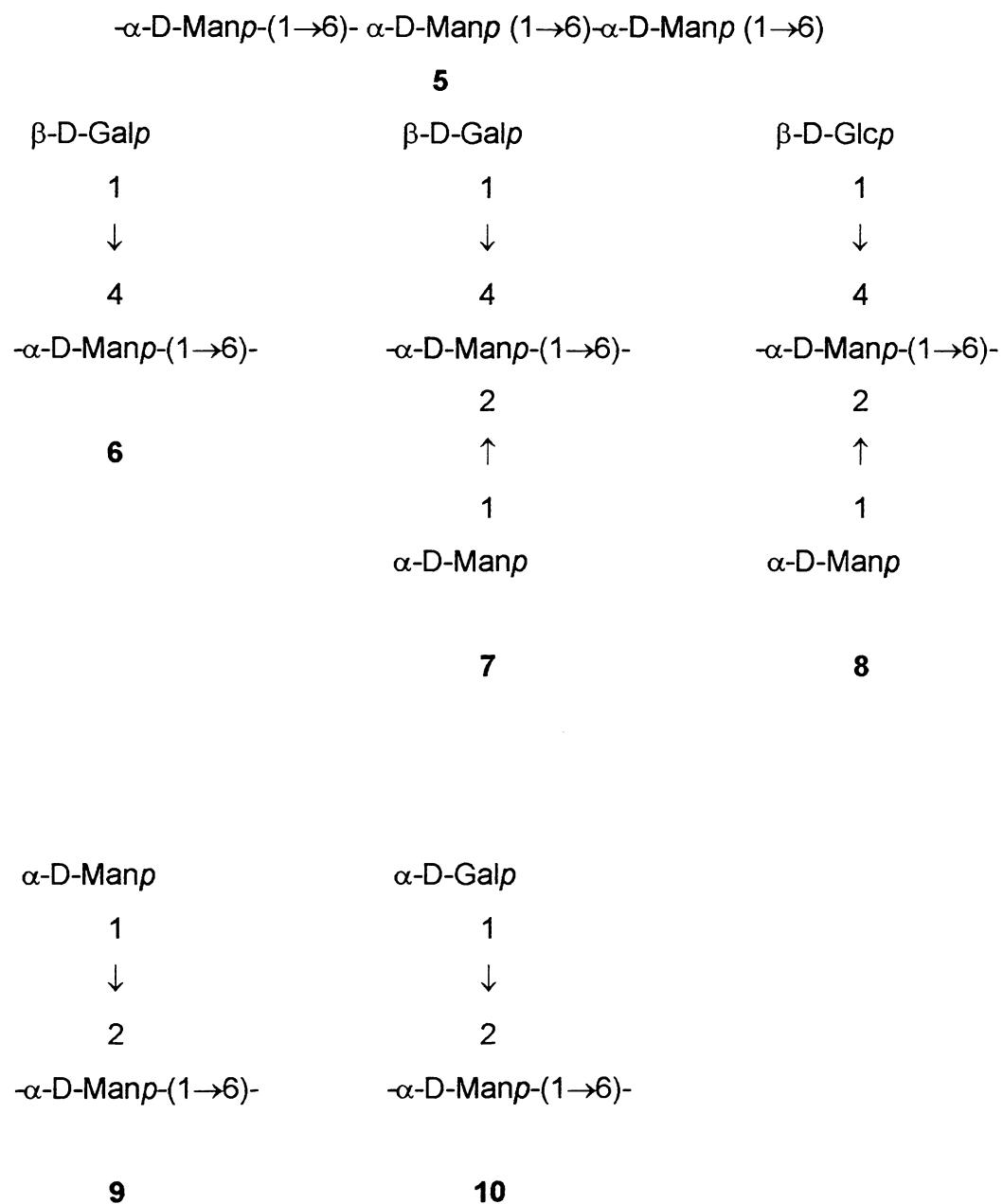
A galactoglucomanana obtida apresentou cadeia principal composta por unidades de α -D-Man ligadas (1→6) e substituídas em diversos padrões, tais como, em O-2 (1), O-4 (2), O-2,4 (3 e 4) (BARREIRA, 1999).



Galactoglucomanana de *Cladonia connexa*

Uma outra galactoglucomanana obtida após precipitação com solução de Fehling do líquen *Cladonia connexa* foi estudada por BARREIRA (1999). Esta apresentou uma relação molar de 55:38:5 para manose, galactose e glucose, respectivamente. A cadeia principal demonstrou ser constituída de unidades de α -D-manopiranose unidas por ligações (1→6) (estrutura 5), essas unidades poderiam estar 4-O substituídas (estrutura 6), 2,4-di-O substituídas (estrutura 7 e 8) e, 2-O substituídas (estrutura 9 e 10) por unidades terminais não redutoras de manopiranose e galactopiranose, principalmente.

Unidades de galactose 3-O-, 4-O-, e/ou 5-O- e 6-O-substituídas e também de glucose 4-O-substituídas indicaram ser pontos de ramificação da molécula (BARREIRA, 1999).



OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo geral avaliar a atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados produzidos por derivatização química a partir de polissacarídeos neutros.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

1. Derivatizar polissacarídeos neutros obtidos dos líquens *Cladonia ibitipocae* e *Cladonia connexa* através da técnica de sulfatação;
2. Determinar o grau de substituição das moléculas sulfatadas;
3. Analisar a estrutura dos polissacarídeos sulfatados, por estudos de Ressonância Magnética Nuclear;
4. Analisar a homogeneidade dos polissacarídeos quimicamente modificados por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC);
5. Testar a atividade anticoagulante das moléculas sulfatadas através dos testes Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (APTT) e Tempo de Trombina (TT);

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAÇÃO DE SULFATAÇÃO

As galactoglucomananas provenientes dos liquens das espécies *Cladonia ibitipocae* e *Cladonia connexa* utilizadas para a sulfatação foram cedidas gentilmente pela Dra Sandra Mara Woranovisz Barreira, as quais encontravam-se identificadas quimicamente pela mesma.

As sulfatações das galactoglucomananas foram realizadas através da metodologia descrita por O'NEILL (1955). Para tal, os polissacarídeos nativos de ambos os liquens, foram dissolvidas em formamida (solvente) e piridina (solvente/catalisador) sob agitação, tomando o devido cuidado para não hidratar o sistema, através de uma boa vedação e troca das pipetas utilizadas. As proporções descritas por O'NEILL para formamida e piridina foram respeitadas a não ser quando foi necessário adicionar uma maior quantidade de formamida para dissolver o polissacarídeo. A quantidade utilizada de ácido clorosulfônico (agente sulfatante) foi em excesso, para garantir uma completa sulfatação. A agitação foi processada até que todo material estivesse completamente dissolvido. Após completa dissolução, a mistura reacional foi colocada sob banho de gelo e adicionou-se gota a gota o ácido clorosulfônico, evitando a entrada de umidade no meio reacional. A agitação e o banho de gelo foram mantidos por mais 2 horas. Decorrido este tempo, o sistema foi mantido a 4°C por 24 horas.

O bloqueio da reação foi realizado através da adição de uma quantidade igual ao volume da reação de gelo e neutralizada com uma solução de bicarbonato de sódio 10% até que a liberação de CO₂ cessasse. A solução obtida foi dialisada exaustivamente contra água corrente por 6 dias (aproximadamente) e, posteriormente, liofilizada, obtendo-se assim o sal sódico do derivado sulfatado.

As reações de sulfatação foram repetidas por mais quatro vezes para cada galactoglucomanana, obtendo-se as frações S1, S2, S3, S4 e S5 para os derivados sulfatados da galactomanana de *C. ibitipocae* e S1a, S2a, S3a, S4a e S5a para os derivados sulfatados de *C. connexa*, dependendo do número de processos de sulfatação a que tenham sido submetidos.

3.2 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (D.S.)

O grau de substituição (D.S.) dos derivados sulfatados foram obtidos através do método turbidimétrico por precipitação com uma solução de cloreto de bário / gelatina, descrito por DODGSON e PRICE (1962).

Uma amostra de cada polissacarídeo sulfatado (4 mg) foi hidrolisada com 4 ml de ácido clorídrico 1 M por 5 horas a 100°C. Uma alíquota de 0,5 ml do hidrolisado foi tratada com 3,5 ml de TCA a 3% e com 1,0 ml de solução de cloreto de bário / gelatina recém preparada. A mistura reacional permaneceu 15 minutos à temperatura ambiente e a absorbância desenvolvida foi determinada a 360 nm contra o tubo branco preparado com água ao invés da amostra hidrolisada. O teor de sulfato foi determinado em relação a uma curva padrão de sulfato de sódio (20 a 180 µg/ml).

O reagente gelatina-cloreto de bário foi preparado da seguinte maneira: 200 mg de gelatina isenta de sulfato foi solubilizada em 40 ml de água e deixada em geladeira por 6 horas, adicionou-se em seguida 200 mg de cloreto de bário e a solução permaneceu na geladeira por mais 3 horas.

O D.S. foi determinado a partir da seguinte relação:

$$D.S. = 162 \times S / 3200 - 102 \times S$$

Onde S representa o teor de enxofre dado em % (WHISTLER e SPENCER, 1964)

3.3 DETERMINAÇÃO DA HOMOGENEIDADE

As galactoglucomananas sulfatadas e nativas foram solubilizadas em água na concentração de 2 mg/mL e filtradas em membranas de acetato de celulose de 0.4 µM e, na seqüência, em membrana de 0.22 µM. Em seguida, foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN

DSP com 18 canais, acoplados em série. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação WATERS, com limites de exclusão de 1.10^6 , 4.10^5 , 8.10^4 e 5.10^3 , em série. O eluente utilizado foi uma solução de NaNO_2 0,1 M.L⁻¹ contendo NaN_3 200 ppm, com fluxo de 0,6 mL/min, pressão de 920 psi a 30°C, monitorados através de bomba peristáltica WATERS 515.

3.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (RMN ^{13}C)

Os espectros de RMN ^{13}C , dos polissacarídeos nativos e sulfatados foram obtidos a partir do espectrofotômetro BRUKER, série AVANCE, modelo DRX-400 e no aparelho AMX-400 (Instituto G. Ronzoni - Milão-Itália), respectivamente, ambos acoplados a um transformador de Fourier, sendo que a freqüência de ressonância foi de 100 MHz.

Os polissacarídeos nativos e sulfatados foram solubilizados em água deuterada (D_2O) e os espectros obtidos a 50°C, os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em p.p.m., utilizando como padrão interno acetona ($\delta= 30.2$), para os polissacarídeos nativos e TMS ($\delta= 0$) para os polissacarídeos sulfatados.

3.5 TESTES DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

Os testes para medir a ação anticoagulante dos polissacarídeos nativos e sulfatados foram realizados no coagulômetro COAG-A-MATE XM da marca Organon Téknica, o qual realiza a leitura foto-óptica da coagulação. Os *pools* de plasma humanos normais utilizados foram cedidos semanalmente pelo Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, sob o aval da Farmacêutica Bioquímica Dra Lismara Kafka do Bomfim.

3.5.1 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (APTT)

Os polissacarídeos nativos e sulfatados foram diluídos em salina em diversas concentrações e adicionados ao plasma humano normal, com a finalidade de obter a concentração mínima de polissacarídeo necessária para tornar o plasma incoagulável. Foi estipulado o tempo de 120 segundos para o teste APTT.

Os testes APTT foram realizados da seguinte maneira: 100 µl de plasma humano normal contendo 10 µl da solução de polissacarídeo nativo ou sulfatado, ou ainda heparina padrão (142 UI/mg) em diversas concentrações, foram incubados separadamente a 37°C por 1 minuto; em seguida adicionava-se 100 µl de cefalina bovina/sílica micronizada (IL Test™) e a incubação persistia por mais 3 minutos a 37°C, decorrido este tempo adicionava-se cloreto de cálcio (CaCl₂) 25 mM (IL Test™) e o tempo que o plasma demorava a coagular era então medido.

O tempo máximo de ensaio foi de 120 segundos, os resultados foram expressos em µg de polissacarídeo/mL de plasma e o tempo gasto para ocorrer à coagulação foi expresso em segundos.

3.5.2 Tempo de Trombina (TT)

Do mesmo modo que para o teste APTT, os polissacarídeos sulfatados e nativos foram diluídos em salina em diversas concentrações com a finalidade de obter a concentração mínima de polissacarídeo necessária na qual o plasma não coagula. O tempo estipulado para o plasma ser considerado incoagulável foi 100 segundos.

Os testes TT foram realizados utilizando 100 µl de plasma humano normal contendo 10 µl da solução de polissacarídeo nativo, sulfatado ou heparina em diversas concentrações. Esta quantidade de plasma com diferentes concentrações de polissacarídeo era incubada a 37°C por 2 minutos, decorrido este tempo adicionava-se 200 µl de trombina (Dade Behring) e o tempo gasto para ocorrer à coagulação era medido.

O tempo máximo de ensaio foi de 100 segundos, os resultados foram expressos em μg de polissacarídeo/mL de plasma e o tempo gasto para ocorrer à coagulação foi expresso em segundos.

A potência anticoagulante relativa (PAR) dos derivados sulfatados de *C. ibitipocae* (S1 a S5) e de *C. connexa* (S1a S5a), tanto para o teste APTT como para o teste TT, foi determinada através da seguinte relação (SYNGIER e FORTES, 1982):

Concentração mínima de heparina padrão que provoca o efeito anticoagulante
Concentração mínima do polissacarídeo sulfatado que provoca o mesmo efeito

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS DERIVATIZADOS

A sulfatação com ácido clorosulfônico-piridina mostrou ser um método eficiente para os polissacarídeos estudados, utiliza-se neste processo como catalisador piridina, a qual possui um par de elétrons disponível que pode formar pontes de hidrogênio com as hidroxilas livres dos polissacarídeos e isto faz com que a nucleofilia desses grupamentos aumente, tornando-os mais reativos (HAINES, 1976).

O uso do ácido clorosulfônico como agente sulfatante apresenta certas desvantagens, uma delas é a dificuldade de manuseá-lo, por ser um reagente tóxico e cáustico (TURVEY, 1965). A umidade deve ser evitada no sistema, pois a água reage com o ácido clorosulfônico inativando-o (ALBAN *et al.*, 1992). A formamida tem a função de melhorar a dissolução do polissacarídeo no sistema.

O grau de sulfatação pode ser aumentado através do aumento da temperatura para 65-70°C e da proporção do ácido clorosulfônico na reação, mas o polissacarídeo poderá ser severamente degradado e, consequentemente, perder suas propriedades (O'NEILL, 1955), porém, para evitar a degradação dos polissacarídeos, as reações de sulfatação foram realizadas a 0°C, neste trabalho.

4.1.1 Determinação dos Graus de Substituição (D.S.)

O método turbidimétrico empregando o reagente cloreto de bário/gelatina descrito por DODGSON e PRICE (1962) é uma técnica que envolve hidrólise ácida, seguida pela determinação do sulfato inorgânico liberado, o qual é medido espectrofotometricamente como sulfato de bário. Apresenta a vantagem de ser simples e rápido, requerer pequenas quantidades de material e estar menos sujeito à interferência de outros materiais que possam estar presentes (DODGSON, 1961; DODGSON e PRICE, 1962). A interferência é provavelmente minimizada pela considerável diluição que ocorre quando grandes volumes de ácido tricloroacético são

adicionados a reação. A gelatina é usada como um estabilizador da turbidez desenvolvida quando o sulfato da amostra reage com o cloreto de bário formando sulfato de bário, e este fica suspenso por mais tempo para que a turbidez seja lida em espectrofotômetro (DODGSON, 1961; DODGSON e PRICE, 1962).

Os estudos de sulfatação desenvolvidos com as espécies de *C. ibitipocae* e *C. connexa* estão demonstrados na Tabela 1, sendo que foram desenvolvidas cinco sulfatações, em cada polímero, na tentativa de alcançar elevado grau de substituição.

TABELA 1 - GRAUS DE SUBSTITUIÇÃO (D.S.) E PORCENTAGEM DE ENXOFRE (%S) DOS DERIVADOS SULFATADOS DA GALACTOGLUCOMANANA DE *C. ibitipocae* e *C. connexa*

Líquen	Derivado sulfatado	D.S.	% S
<i>C. ibitipocae</i>	S1	0.20	3.5
	S2	0.51	7.6
	S3	0.87	11.1
	S4	1.08	12.7
	S5	1.29	14.0
<i>C. connexa</i>	S1a	0.24	4.1
	S2a	0.50	7.5
	S3a	0.98	11.9
	S4a	1.21	13.6
	S5a	1.54	15.5

O grau de substituição obtido na primeira sulfatação foi baixo para ambas espécies, sendo este fator atribuído provavelmente à diminuição do poder sulfatante do ácido clorosulfônico, pela inativação do mesmo na presença de água. Por esse motivo as galactoglucomananas sulfatadas foram submetidas a novas sulfatações objetivando aumentar o grau de sulfatação e, consequentemente, a atividade anticoagulante.

Ainda pode-se constatar que as reações de sulfatação ocorreram, efetivamente, a cada processo de derivatização, já que o D.S. e a % de S aumentam de forma gradual, onde se atingiu um valor máximo de 1,54 e 15,5% para a *C. connexa* e 1,29 e 14% para a *C. ibitipocae*, respectivamente.

4.1.2 Análise por RMN ^{13}C

4.1.2.1 Galactoglucomanana de *C. ibitipocae* nativa e sulfatada

As análises das galactoglucomananas de *C. ibitipocae* sulfatadas, por RMN ^{13}C , forneceram espectros com sinais alargados e com baixa resolução, devido ao aumento da massa molar pela introdução dos grupos sulfato. Esses grupamentos dificultam a mobilidade molecular, impedindo a aquisição dos sinais, levando a um alargamento dos mesmos e diminuição da resolução espectral. Estes dados também são observados em polímeros sulfatados citados na literatura.

O espectro de RMN ^{13}C obtido para a galactoglucomanana nativa de *C. ibitipocae* apresenta sinais na região de C1 em δ 107,9; 102,9; 101,6 e 98,7 (Figura 3A), que correspondem, respectivamente, a unidades β -D-Galf (GORIN *et al.*, 1981), a grupos terminais não redutores de β -D-Galp ligados (1→4) (GORIN e MAZUREK, 1975), a unidades de α -D-Manp ligadas (1→2) a unidades de α -D-Manp (IACOMINI *et al.*, 1985) e a unidades de α -D-Manp da cadeia principal 6-O-substituída (GORIN, 1981). Os sinais a δ 60,6 e 62,6 correspondem ao C-6 das unidades das galactopiranose e manopiranose livres, respectivamente.

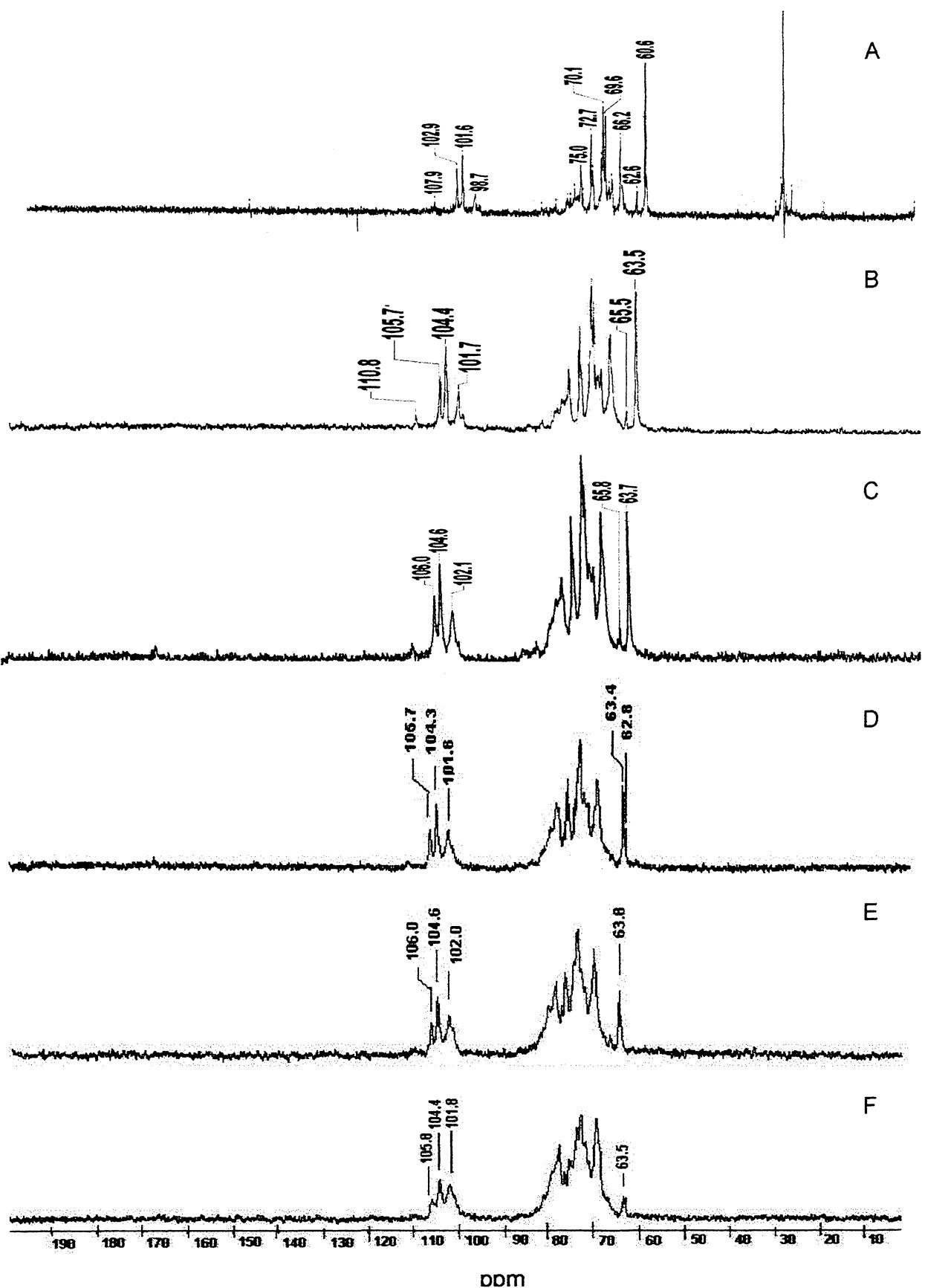


FIGURA 3 - ESPECTROS DE RMN¹³C das GALACTOGLUCOMANANAS DE *C. ibitipocae* NATIVA (A), S1 D.S 0,20 (B), S2 D.S 0,51 (C), S3 D.S 0,87 (D), S4 D.S 1,08 (E) e S5 D.S 1,29 (F), em água deuterada (D₂O), a 50°C. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em p.p.m.

A medida em que foram desenvolvidas as sulfatações (S1 a S5) no polímero de *C. ibitipocae*, observa-se por estudos de RMN ^{13}C , que ocorreu uma redução na intensidade dos sinais da região de C-6 livre (Figura 3B-3F), indicando que esta é uma das posições que foram sulfatadas.

A sulfatação introduz um deslocamento de C-6 para campo mais baixo em uma média de + 6.5 ppm, acompanhado por pequeno deslocamento para campo mais alto dos sinais dos átomos adjacentes, de 0,1 a - 2.0 ppm (DOCTOR e ESHO, 1983; PHILIPP *et al.*, 1987; GORIN, 1981). O grupo hidroxil primário presente em C-6 é preferencialmente sulfatado, seguido pelos grupos hidroxil de C-2 e C-4 segundo, DOCTOR e ESHO (1983) e ALBAN *et al.* (1992). Embora a molécula tenha sido submetida a cinco sulfatações ainda permanecem unidades com o C-6 livre (δ 63.5).

4.1.2.2. Galactoglucomanana de *C. connexa* nativa e sulfatada

Do mesmo modo que para as galactoglucomananas sulfatadas de *C. ibitipocae*, as galactoglucomananas de *C. connexa* também apresentam espectros de RMN ^{13}C com sinais mais alargados e com resolução comprometida, devido à introdução do grupamento sulfato que dificulta a mobilidade molecular e a aquisição de sinais. O espectro de RMN ^{13}C da galactoglucomanana nativa de *C. connexa* (Figura 4A) mostrou sinais na região de C-1 em δ 103,2 e 100,5 que correspondem, respectivamente, a unidades de extremidades não redutoras de β -D-Galp ligadas (1→4) à α -D-Manp 6-O substituída (GORIN e MAZUREK, 1975; HALL e JOHNSON, 1969) e a unidades 2,4-di-O-substituídas da cadeia principal de α -D-Manp-(1→6) (GORIN e IACOMINI, 1984, 1985).

Sinais menores em δ 102,2; 99,0 e 98,1 também são observados, onde o sinal em δ 102,2 é característico de extremidades não redutoras de α -D-Manp ligadas(1→2) à α -D-Manp 6-O-substituída (IACOMINI *et al.*, 1985). Os sinais a δ 99,0 e 98,1 podem corresponder, respectivamente, às unidades da cadeia principal de α -D-Manp ligadas (1→6), que são Manp 6-O-substituída e substituídas em O-2 por cadeias laterais, ou

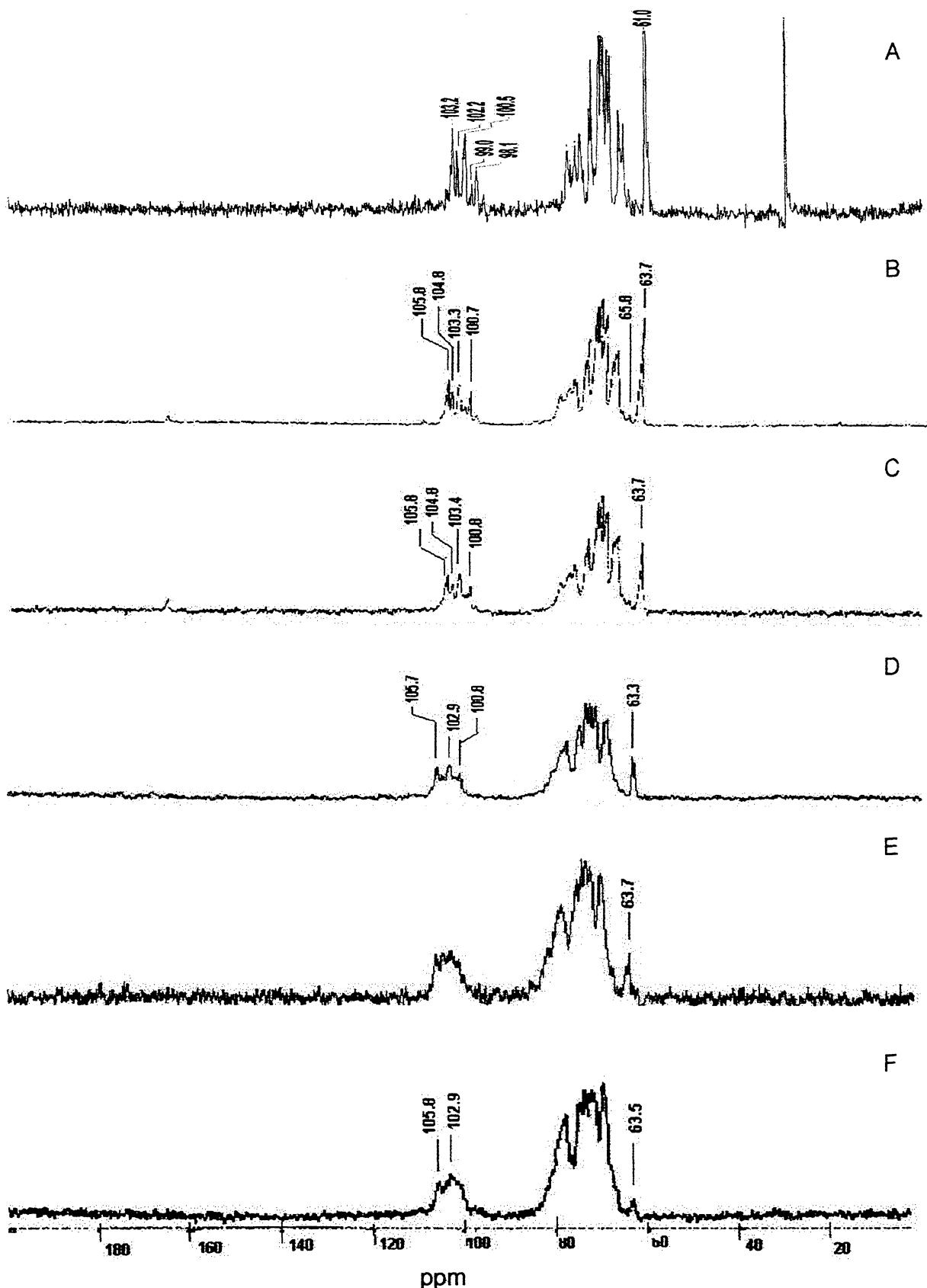


FIGURA 4 - ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS GALACTOGLUCOMANANAS de *C. connexa* NATIVA (A), S1a D.S 0,24 (B); S2a D.S 0,50 (C); S3a D.S 0,98 (D); S4a D.S 1,21 (E); S5a D.S 1,54 (F), em água deuterada (D_2O), a 50°C. Os deslocamentos químicos foram expressos em p.p.m.

seja, 2,6-di-O-substituidas (GORIN e MAZUREK, 1982). O sinal a δ 61,0 corresponde ao C-6 livre das unidades de galactopiranose.

As análises dos espectros de RMN ^{13}C das galactoglucomananas sulfatadas de *C. connexa* (Figura 4B-4F), assim como para as galactoglucomananas sulfatadas de *C. ibitipocae*, demonstraram que ocorreu uma redução dos sinais da região de C-6 livre a medida que se aumenta o D.S. destes polissacarídeos, indicando que o carbono 6 está sendo sulfatado preferencialmente (DOCTOR e ESHO, 1983; ALBAN *et al.*, 1992), como também observado para a *C. ibitipocae*.

A análise da região do espectro de RMN compreendida pelos carbonos C-2 a C-5 torna-se impossível, tanto para os derivados sulfatados de *C. ibitipocae* quanto para *C. connexa*, a medida que a molécula vai sendo sulfatada devido a sobreposição de sinais e por uma baixa resolução espectral, devido ao alargamento dos mesmos (DOCTOR e ESHO, 1983).

4.2 DETERMINAÇÃO DA HOMOGENEIDADE

4.2.1 Galactoglucomanana de *C. ibitipocae* Nativa e Sulfatada

A determinação da homogeneidade foi realizada por HPSEC (Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão), como descrita nos materiais e métodos (ítem 3.3). Os perfis cromatográficos da amostra nativa e das moléculas sulfatadas da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* estão demonstrados na Figura 5. Para a molécula nativa observou-se que esta se apresenta heterogênea.

As moléculas sulfatadas (S1 a S5) mostram-se heterogêneas, fato que pode ser observado pelo surgimento de um outro pico no cromatograma que, por sua vez pode ser decorrente da degradação da molécula devido ao processo de sulfatação. A degradação de moléculas após a derivatização, também foi observada por STUEL P (1997). Podemos observar que o novo pico acentua-se à medida que as sulfatações

são realizadas. De acordo com os resultados obtidos, os derivados S1 a S5 constituem populações de moléculas com massas molares diferentes.

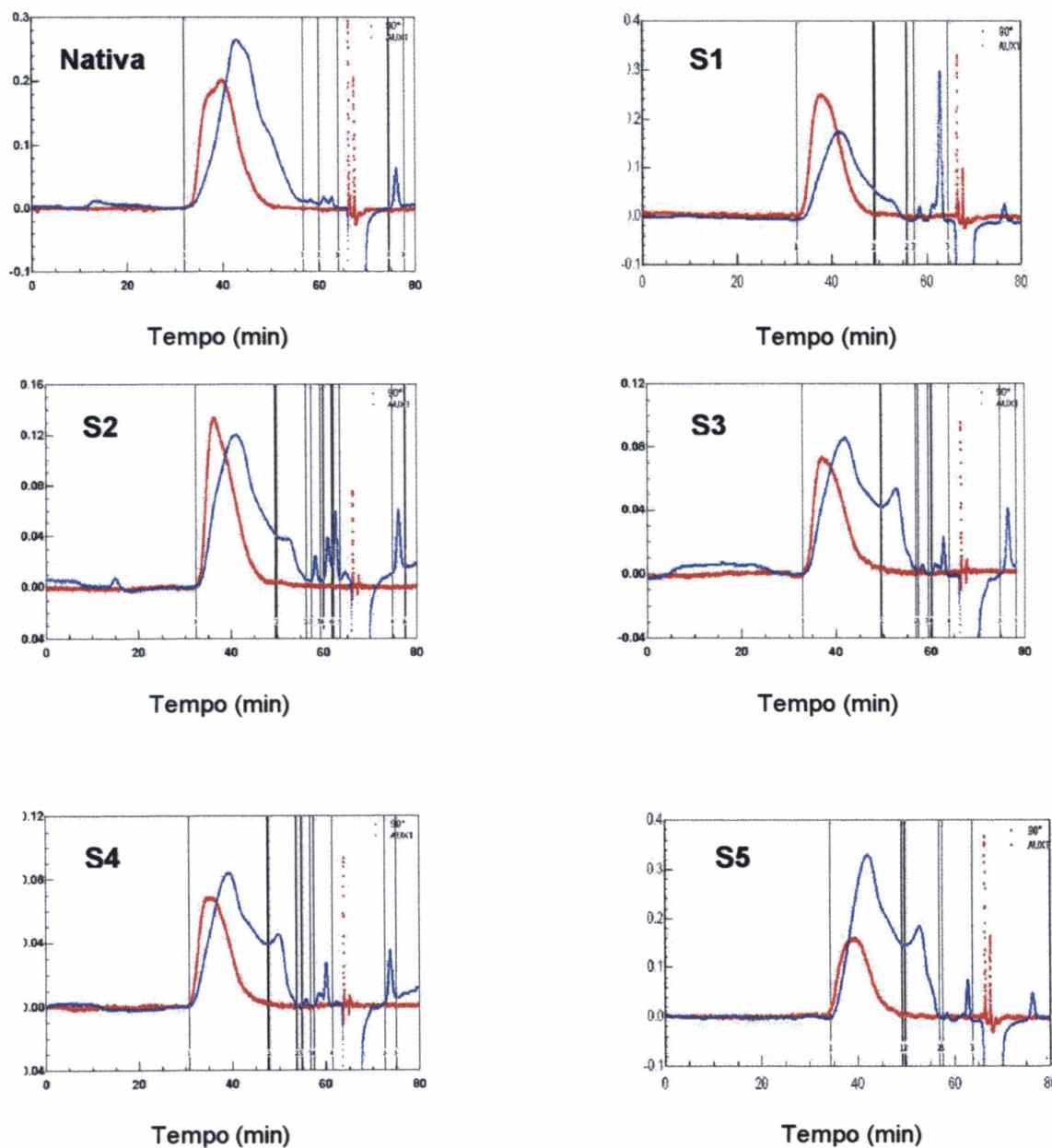


FIGURA 5 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DE *C. ibitipocae* E SEUS DERIVADOS SULFATADOS (gráficos S1 a S5) ATRAVÉS DE SEC-MALLS. UTILIZANDO-SE DETECTORES DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (azul) E ESPALHAMENTO DE LUZ (vermelho).

4.2.2 Galactoglucomanana de *C. connexa* Nativa e Sulfatada

A galactoglucomanana nativa de *C. connexa* por análise de cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) demonstrou ser heterogênea conforme demonstrado na figura 6, por apresentar um pequeno ombro. Esta mesma molécula foi analisada por BARREIRA (1999) através de GPC (cromatografia de gel permeação) em coluna de Sepharose CL-4B demonstrando ser homogênea.

Tendo em vista que a metodologia empregada neste trabalho é considerada mais sensível do que aquela empregada por BARREIRA (1999), pode-se constatar que a galactoglucomanana de *C. connexa* nativa constitui uma família de galactoglucomanananas com massas molares diferenciadas.

Os derivados S1a a S5a (Figura 6) também são heterogêneos, sendo constituídos de polissacarídeos de diferentes massas molares, como era de se esperar, já que a molécula nativa ao qual estes foram derivatizados é constituída por uma família de galactoglucomanananas com massas molares diferenciadas. Outro fato é que à medida que a molécula é sulfatada surgem picos decorrentes da fragmentação da mesma, em virtude do processo de sulfatação, este fato também foi observado para os polissacarídeos sulfatados de *C. ibitipocae*.

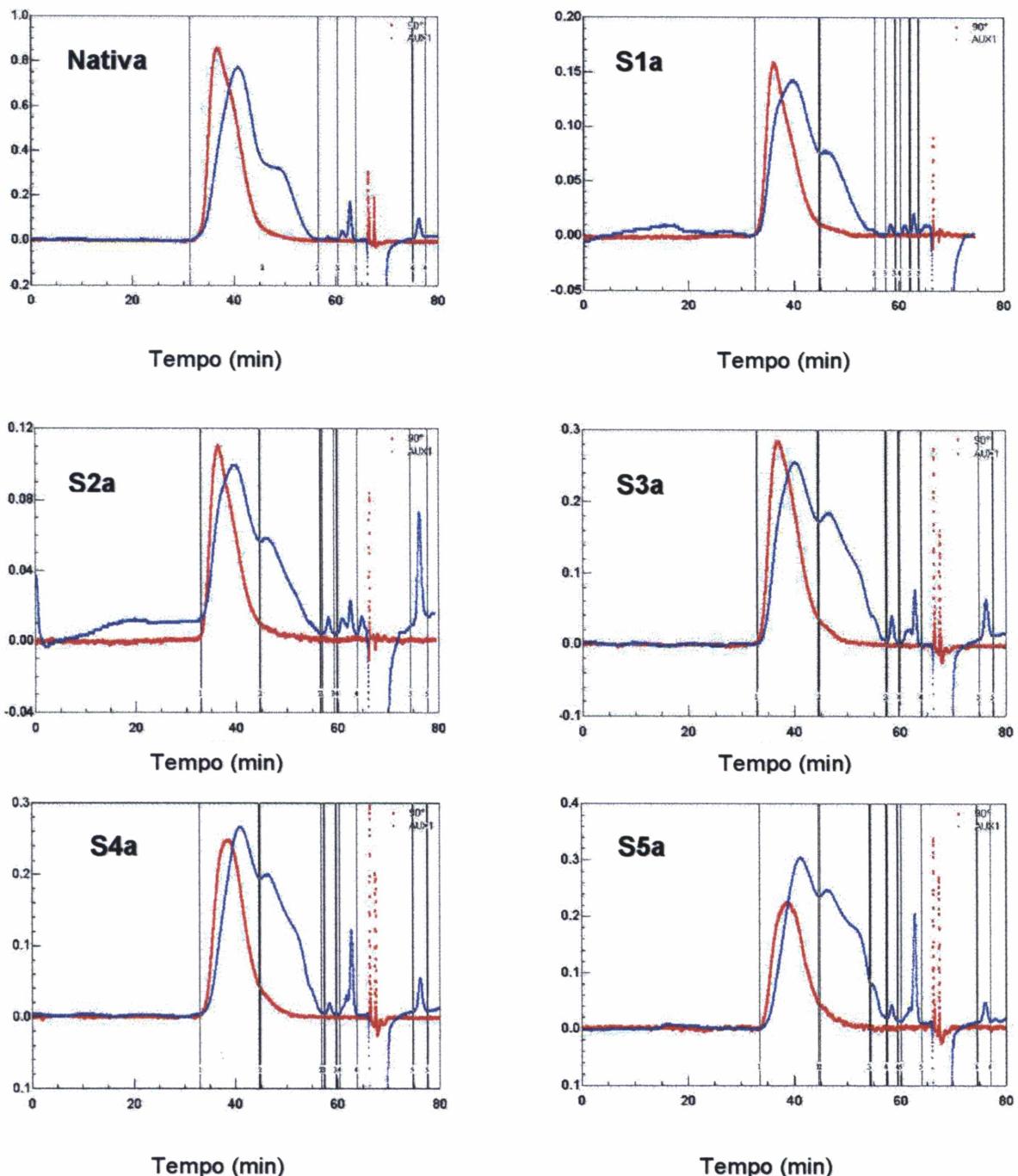


FIGURA 6: PERFIL DE ELUIÇÃO DA GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DE *C. connexa* E SEUS DERIVADOS SULFATADOS (gráficos S1a a S5a) ATRAVÉS DE SEC-MALLS UTILIZANDO-SE DETECTORES DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (azul) E ESPALHAMENTO DE LUZ (vermelho)

4.3 TESTES DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *in vitro*

A atividade anticoagulante dos derivados sulfatados foi determinada através dos testes TT (Tempo de Trombina) e pelo teste do efeito inibitório da via intrínseca da coagulação, avaliado pelo teste APTT (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado).

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 ao plasma citratado do paciente, uma quantidade conhecida de trombina, a qual atua sobre o fibrinogênio formando monômeros de fibrina. A agregação destes 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 específicas de glutamato e lisina, em uma reação de transamidação (DOOLITTLE, 1984). A determinação do tempo de trombina é apropriada para o controle da terapêutica heparínica e fibrinolítica, como prova de investigação de transtornos na formação da fibrina ou para avaliar estados graves de deficiência de fibrinogênio, bem como para avaliar a atividade anticoagulante de heparinóides.

O Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (APTT) baseia-se na ativação do mecanismo intrínseco da coagulação sanguínea, através da cefalina, que é um substituto plaquetário, e da adição de cálcio ao plasma a ser testado. O meio de ativação por contato, necessário para desencadear o processo de coagulação, é obtido pela adição de caolin ou sílica micronizada (FISCHBACH e FOGDALL, 1985; AIZU, 1991; BOURIN e LINDAHL, 1993). O APTT constitui a melhor prova para investigar as alterações do mecanismo da coagulação sanguínea especialmente as deficiências envolvendo os fatores que participam do sistema intrínseco da coagulação (LIMA *et al*, 1992). O prolongamento do APTT pode ser observado nas seguintes situações: deficiência de fator XII, XI, X, IX, VIII, V, II ou fibrinogênio, doenças hepáticas, deficiência de vitamina K, presença de heparina, lupus anticoagulante ou outro inibidor.

Os resultados obtidos para a galactomanana nativa e para os derivados sulfatados de *C. ibitipocae* e *C. connexa* estão demonstrados nas Tabelas 2 e 4 e Figuras 7, 8, 9 e 10. Os resultados obtidos tanto para o teste TT como para o teste APTT foram comparados aos obtidos com a heparina padrão (142 UI/mg).

TABELA 2 - RELAÇÃO ENTRE O D.S E A CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO MÍNIMA PARA TORNAR O PLASMA INCOAGULÁVEL DA GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DA *C. ibitipocae* E SEUS DERIVADOS SULFATADOS

Polissacarídeo	D.S	Concentração mínima ($\mu\text{g/mL}$) para tornar o plasma incoagulável	
		APTT ^(a)	TT ^(b)
Native	—	Normal ^(c)	Normal ^(c)
S1	0.20	85*	125*
S2	0.51	50*	110*
S3	0.87	30*	50*
S4	1.08	25*	45*
S5	1.29	25*	30*
Heparina ^(d)	—	5*	4*

* - valores apresentados em concentração para atingir tempos referentes ao plasma incoagulável (APTT: 120 seg, TT: 100 seg).

(a) - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado.

(b) - Tempo de Trombina.

(c) - Tempo de coagulação semelhante ao pool de plasma controle normal (APTT: 26-32 seg; TT: 14-21 seg).

(d) - Heparina (142 UI/mg).

— Não determinado.

A galactoglucomanana nativa de *C. ibitipocae* não apresentou atividade anticoagulante (Tabela 2), porém todos os derivados sulfatados apresentaram atividade anticoagulante a qual foi dependente do D.S. Ou seja, à medida que aumentou o D.S diminuiu a concentração necessária para tornar o plasma incoagulável e, consequentemente aumentou a atividade anticoagulante, tanto no teste TT como no APTT (Tabela 2, Figuras 7 e 8).

Na análise comparativa, a melhor atividade avaliada pelo teste APTT foi obtida com o derivado S4 (D.S. 1.08) na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ de plasma, enquanto que a maior atividade avaliada pelo teste TT foi com o derivado S5 (D.S. 1.29), o qual na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ de plasma tornou o plasma incoagulável.

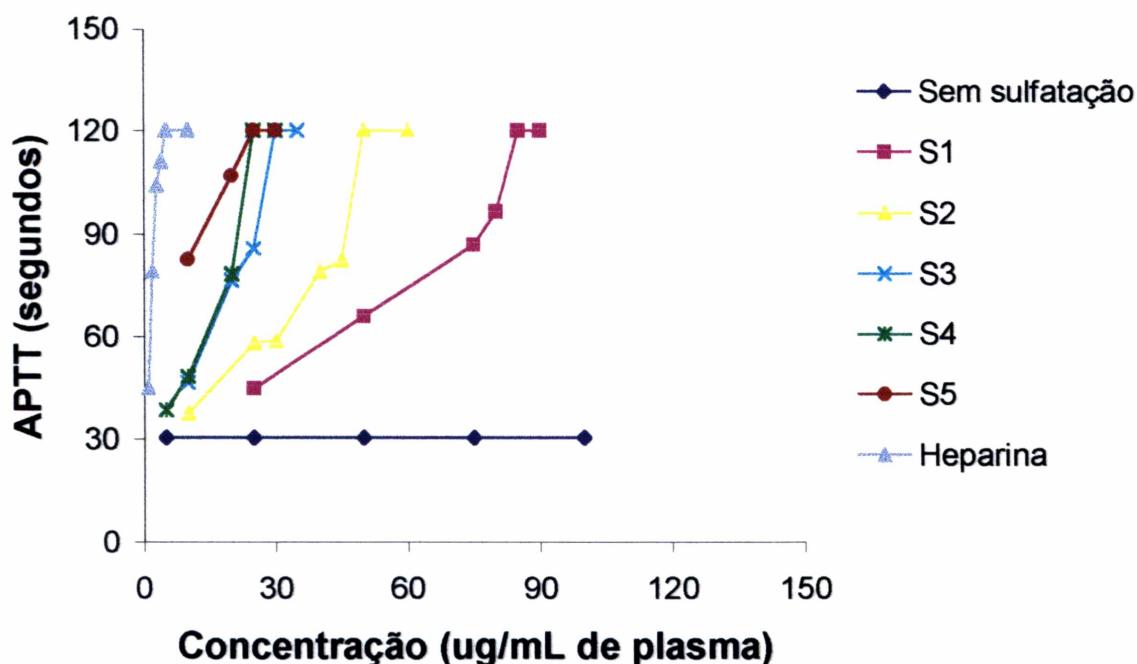


FIGURA 7 - RESULTADOS DOS TESTES APTT REALIZADOS COM A GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DA *C. ibitipocae* E SEUS DERIVADOS SULFATADOS

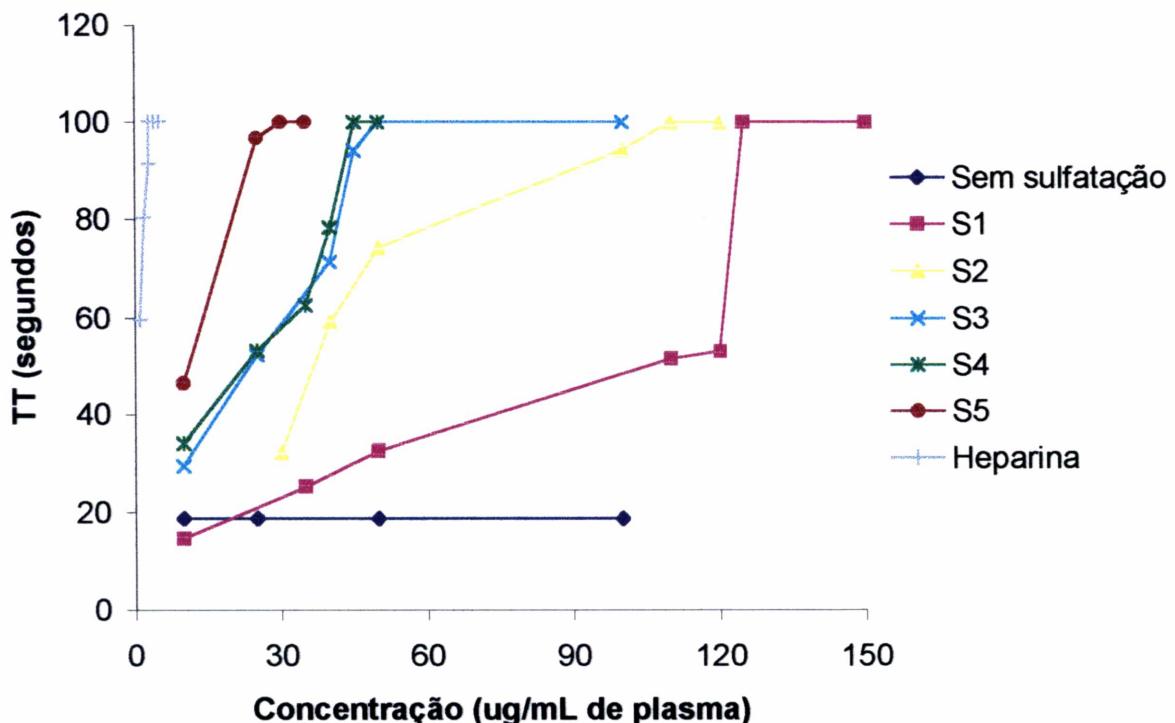


FIGURA 8 - RESULTADOS DOS TESTES TT REALIZADOS COM A GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DA *C. ibitipocae* E SEUS DERIVADOS SULFATADOS

Por mais que o D.S aumente do derivado S4 (D.S 1,08) em relação a S5 (D.S. 1,29) (Tabela 2), a concentração necessária para tornar o plasma incoagulável se mantém no teste APTT em 25 μ g/mL de plasma. Esse comportamento já foi relatado na literatura, segundo NISHINO e NAGUMO (1992) a atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados é dependente dos valores de D.S, até que a proporção sulfato/unidades de açúcar chegue a um, na maioria dos casos e depois disto, a atividade tende a um platô. ALBAN *et al* (1992) relataram que altos graus de substituição podem diminuir a atividade anticoagulante, indicando que um determinado D.S. é importante para uma máxima atividade. Porém, acreditamos que isto somente pode ser concluído através de experimentos, ou seja analisando caso por caso. As

reações de sulfatação foram efetuadas até se obter o derivado S5, devido à atividade ser a mesma que para o derivado S4 no teste APTT.

Analizando-se os testes do TT para os derivados S1 a S5, observa-se que, na medida que eles vão sendo sulfatados a atividade anticoagulante vai melhorando, fato demonstrado pela diminuição da concentração necessária para tornar o plasma incoagulável que vai de 125 µg/mL para o derivado S1 a 30 µg/mL de plasma para o derivado S5. Porém observa-se que, ainda não foram atingidos valores máximos de atividade anticoagulante para estes derivados.

Comparando os resultados obtidos, observa-se que a atividade anticoagulante foi maior no teste do APTT do que no teste do TT para todos os derivados (Tabela 2, Figuras 7 e 8). Esse fato pode indicar que os derivados sulfatados interagem de uma maneira mais eficiente em um ponto relativamente inicial na cascata de coagulação sanguínea (STUEL P, 1997).

Analizando-se as potências anticoagulantes relativas (Tabela 3) dos derivados sulfatados de *C. ibitipocae*, constata-se que, à medida que o grau de substituição aumenta a potência anticoagulante relativa aumenta, tanto para o teste APTT como para o TT, significando que a atividade está melhorando. O valor máximo foi obtido para o derivado S5, onde se atingiu o valor de 0,20 e 0,13 para os testes APTT e TT, respectivamente. Esses valores são 5 e 7,7 vezes menores do que os obtidos para a heparina padrão.

GERMANO (1996) estudou heparinóides obtidos por reação de sulfatação de galactomananas obtidas de *Cassia fastuosa* e *Mimosa scabrela*. Para a galactomanana sulfatada de *Cassia fastuosa*, o grau de sulfatação obtido foi de 0,87 e este derivado na concentração de 12 µg/mL de plasma tornou o plasma incoagulável no teste APTT e no teste TT a concentração que tornou o plasma incoagulável foi de 2 µg/mL de plasma. Comparando os valores de atividade anticoagulante da galactomanana sulfatada de *Cassia fastuosa* com os valores obtidos para o derivado S3 da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* o qual apresenta o mesmo D.S (0.87), observa-se que os valores obtidos para o derivado S3 (30 µg/mL de plasma e 50 µg/mL de plasma para os testes APTT e TT, respectivamente) são inferiores, isso quer dizer que a

atividade anticoagulante de heparinóides não depende apenas do D.S mas, também, da estrutura, composição, posição dos grupos sulfato nos átomos de carbono, massa

TABELA 3 - RELAÇÃO ENTRE D.S E A POTÊNCIA ANTICOAGULANTE RELATIVA (PAR) DOS DERIVADOS SULFATADOS DA *C. ibitipocae* AVALIADOS PELOS TESTES APTT E TT

Polissacarídeo	D.S	Potência anticoagulante relativa (PAR)	
		APTT ^(a)	TT ^(b)
S1a	0,20	0,06	0,03
S2a	0,51	0,10	0,04
S3a	0,87	0,17	0,08
S4a	1,08	0,20	0,09
S5a	1,29	0,20	0,13
Heparina ^(d)	—	1,0	1,0

^(a) - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado.

^(b) - Tempo de Trombina.

molar e conformação da molécula (BODE e FRANZ, 1991). A galactomanana nativa de *Cassia fastuosa* apresenta-se pouco substituída, as unidades de manose e galactose estão em uma razão molar de 4:1, a cadeia principal é formada de unidades β -D-manopiranosil interligadas (1→4), substituída em C-6 por unidades de α -D-galactopiranose (19 mol%), já a galactoglucomanana de *C. ibitipocae* como descrito anteriormente, apresenta-se bastante substituída (Tabela 4). Ou seja, a razão molar de Gal:Glc:Man é de 35:2:60, a cadeia principal é composta por unidades de α -D-Man ligadas (1→6) e substituídas em diversos padrões em O-2 (1), O-4 (2), O-2,4 (3 e 4) (pág. 17) (BARREIRA, 1999).

TABELA 4 - ANÁLISE POR METILAÇÃO DAS GALACTOGLUCOMANANAS DE *C. ibitipocae* e *C. connexa*

O-metilalditol ^b	Heteropolissacarídeo (Mol/%) ^a	
	<i>C. connexa</i>	<i>C. ibitipocae</i>
2,3,4,6-Me ₄ -Man	16	25
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	-	2
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	2	5
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	17	19
3,4,6-Me ₃ -Man	3	-
2,4,6-Me ₃ -Gal	5	-
2,3,4-Me ₃ -Man	12	7
2,3,6-Me ₃ -Gal	11	-
2,3,6-Me ₃ -Glc	5	-
2,3,4-Me ₃ -Gal	3	-
2,3-Me ₂ -Man	7	3
3,4-Me ₂ -Man	2	7
3-Me-Man	15	27

^a Proporção (%) da área do pico relativa à área total dos picos.

^b Analisado como peracetato.

FONTE: Adaptado de: BARREIRA, 1999.

Tendo em vista as diferenças estruturais das moléculas, obviamente por mais que seus derivados apresentem o mesmo D.S. suas estruturas são completamente distintas, por esse motivo a atividade anticoagulante de ambos os derivados diferem.

Por outro lado, comparando o derivado S2 (D.S. 0.51) com o derivado α -glucana S1 (D.S.0.48) obtido por STUEL P (1997) por derivatização química de uma α -glucana (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) ligada na proporção 3:1 extraída do líquen *Ramalina celastri*, o derivado α -glucana S1, demonstrou possuir uma atividade anticoagulante menor do que o derivado S2, quando avaliado pelo teste APTT. A α -glucana S1 na concentração de 60 μ g/mL de plasma tornou o plasma incoagulável no teste APTT, enquanto que para o derivado S2 isto ocorreu na concentração de 50 μ g/mL de plasma. Estes resultados suportam o fato que não é apenas o D.S. o responsável pela atividade anticoagulante de heparinóides (BODE e FRANZ, 1991).

Os resultados obtidos com a galactoglucomanana de *C. connexa* e seus derivados sulfatados (Tabela 5, Figuras 9 e 10), foram semelhantes aos obtidos com a

C. ibitipocae. Todos os derivados sulfatados apresentaram atividade anticoagulante a qual foi dependente do D.S e, à medida que esse aumentou, diminuiu a concentração necessária para tornar o plasma incoagulável e consequentemente aumentou a atividade anticoagulante tanto no teste do TT como no do APTT.

A concentração necessária para tornar o plasma incoagulável se mantém no teste APTT e TT, por mais que o D.S aumente do derivado S4a (D.S. 1,21) em relação ao derivado S5a (D.S. 1,54).

TABELA 5 - RELAÇÃO ENTRE O D.S E A CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO MÍNIMA PARA TORNAR O PLASMA INCOAGULÁVEL DA GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DA *C. connexa* E SEUS DERIVADOS SULFATADOS

Polissacarídeo	D.S	Concentração mínima ($\mu\text{g/mL}$) para tornar o plasma incoagulável	
		APTT ^(a)	TT ^(b)
Native	—	Normal ^(c)	Normal ^(c)
S1a	0,24	130*	170*
S2a	0,50	55*	80*
S3a	0,98	30*	40*
S4a	1,21	25*	30*
S5a	1,54	25*	30*
Heparina ^(d)	—	5*	4*

* - valores apresentados em concentração para atingir tempos referentes ao plasma incoagulável (APTT: 120 seg, TT: 100 seg).

(a) - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado.

(b) - Tempo de Trombina.

(c) - Tempo de coagulação semelhante ao "pool" de plasma controle normal (APTT: 26-32 seg; TT: 14-21 seg).

(d) - Heparina (142 UI/mg).

— Não determinado.

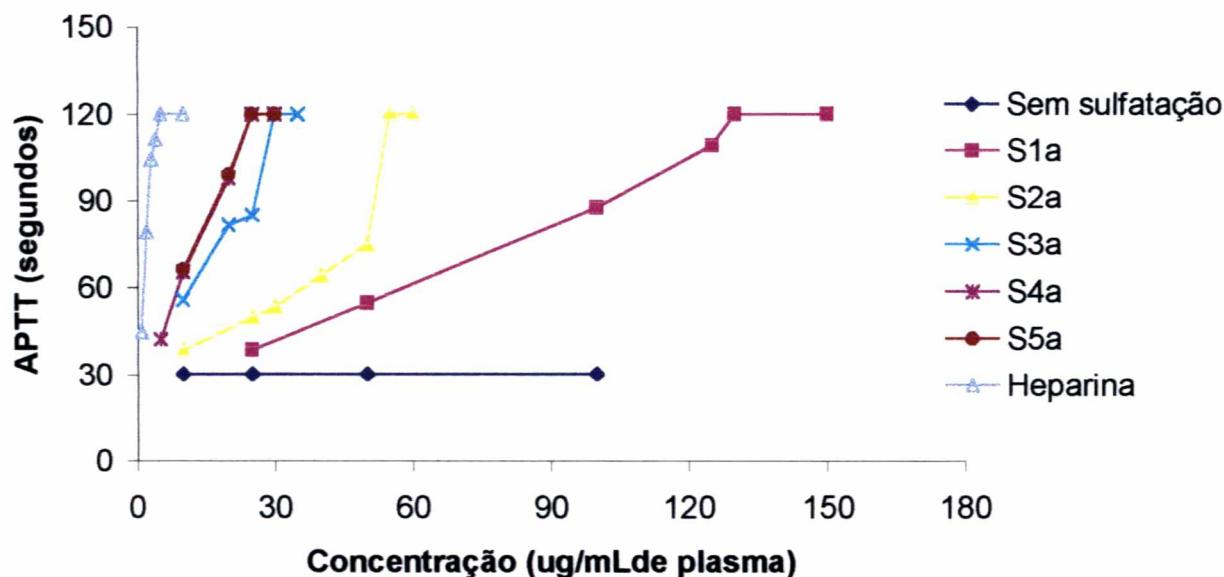


FIGURA 9 - RESULTADOS DOS TESTES APTT REALIZADOS COM A GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DA *C. connexa* E SEUS DERIVADOS SULFATADOS.

Para esses derivados sulfatados a atividade anticoagulante, também, foi maior no teste APTT do que no teste TT e todos os derivados apresentaram atividade menor que a heparina. Analisando-se as potências anticoagulantes relativas observa-se que os derivados S4a e S5a apresentam uma atividade 5 vezes menor no teste APTT e 7,7 vezes menor no teste TT, quando comparados com a heparina padrão (Tabela 6, Figuras 9 e 10).

Os resultados obtidos tanto para os derivados sulfatados de *C. ibitipocae* como de *C. connexa* confirmaram os dados encontrados na literatura, nos quais a atividade anticoagulante aumenta com o aumento do D.S.

PIRES (1998) estudando heparinóides obtidos por sulfatação química de uma galactomanana parcialmente purificada de endosperma de sementes de *Senna*

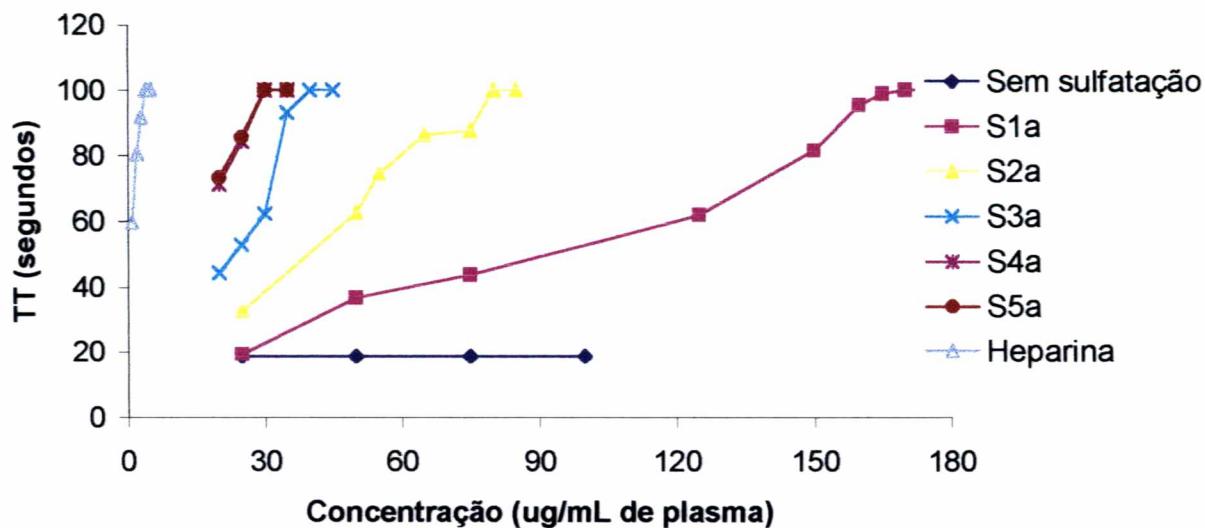


FIGURA 10 - RESULTADOS DOS TESTES TT REALIZADOS COM A GALACTOGLUCOMANANA NATIVA DA *C. connexa* E SEUS DERIVADOS SULFATADOS.

macranthera, com uma relação molar de manose e galactose de 3,3:1, obteve um D.S de 0,54 e a concentração necessária para tornar o plasma não coagulável foi de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de plasma, no teste APTT. Comparando este valor com o obtido para o derivado S2a com D.S 0,50 (Tabela 5), observa-se que a concentração necessária para tornar o plasma não coagulável é maior que a obtida por PIRES (1998). Esses resultados reforçam a idéia que a atividade anticoagulante de heparinóides não depende apenas do D.S (BODE e FRANZ, 1991).

A diferença na atividade anticoagulante desses dois heparinóides com graus de substituição parecidos, provavelmente deve-se ao fato de ambos apresentarem estruturas diferentes. A galactoglucomanana de *C. connexa* apresenta relação molar de Gal:Glc:Man de 38:5:55, é constituída de unidades de α -D-manopiranose unidas por ligações (1 \rightarrow 6), que fazem parte da cadeia principal. Essas unidades podem estar 4-O-, 2,4-di-O- e 2-O- substituídas por unidades terminais não redutoras de manopiranose e galactopiranose, principalmente. Unidades de galactose 3-O-, 4-O- e/ou 5-O-, 6-O-

substituídas e glucose 4-O-substituída são pontos de ramificação da molécula (BARREIRA, 1999).

TABELA 6 - RELAÇÃO ENTRE O D.S E A POTÊNCIA ANTICOAGULANTE RELATIVA (PAR) DOS DERIVADOS SULFATADOS DA *C. connexa* AVALIADOS PELOS TESTES APTT E TT

Polissacarídeo	D.S	Potência anticoagulante relativa (PAR)	
		APTT ^(a)	TT ^(b)
S1a	0,24	0,04	0,02
S2a	0,50	0,09	0,05
S3a	0,98	0,16	0,1
S4a	1,21	0,20	0,13
S5a	1,54	0,20	0,13
Heparina ^(d)	—	1,0	1,0

^(a) - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado.

^(b) - Tempo de Trombina.

Comparando os derivados S1 (D.S. 0,20) de *C. ibitipocae* com o derivado S1a (D.S. 0,24) de *C. connexa*, os quais apresentam D.S. similares, observa-se que o derivado S1 apresenta melhor atividade anticoagulante, pois no teste APTT e no teste TT a concentração necessária para tornar o plasma não coagulável foi de 85 e 125 µg/mL; enquanto que, para o derivado S1a, esses valores foram de 130 e 170 µg/mL de plasma, respectivamente. Como os D.S. são parecidos as atividades desses derivados parecem ser devido não apenas ao conteúdo de sulfato presente nas moléculas, mas de algum outro fator como a posição em que estes grupos estão presentes nas, já que as moléculas nativas dos quais esses derivados foram obtidos apresentam composição monossacarídica similar, mesmos tipos de ligação, diferindo apenas na proporção de ramificação da cadeia principal. Como pode ser observado na Tabela 4, a galactoglucomanana de *C. connexa* é menos substituída que a de *C. ibitipocae* e esta, por sua vez, é menos complexa (BARREIRA, 1999).

Analizando os derivados S2 e S2a quanto ao teste APTT (Tabelas 2 e 5), os quais apresentam graus de substituição praticamente idênticos com valores de 0,51 e 0,50, respectivamente, observa-se que a atividade anticoagulante de ambos é muito próxima, isto parece ser devido ao conteúdo de sulfato desses dois derivados serem praticamente idênticos. Outros fatores que influenciam a atividade anticoagulante neste caso parecem não estarem determinando a atividade, porém não podem ser descartados.

Comparando os demais derivados obtidos da galactoglucomanana de *C. ibitipocae* (S3 a S5) com os derivados da galactoglucomanana de *C. connexa* (S3a a S5a), observa-se que o D.S. dos derivados S3 a S5 são menores do que os D.S. dos derivados S3a a S5a (Tabelas 2 e 5), isto pode ser atribuído ao fato que a galactoglucomanana de *C. ibitipocae* é mais ramificada que a galactoglucomanana de *C. connexa* e, portanto, o acesso dos grupos sulfato as unidades monossacarídicas toma-se mais difícil durante o processo de sulfatação.

Embora os graus de substituição dos derivados S3, S4 e S5 (0,87; 1,08 e 1,29, respectivamente) sejam menores que os graus de substituição dos derivados S3a, S4a e S5a (0,98; 1,21 e 1,54, respectivamente), a atividade anticoagulante avaliada pelo

teste APTT é a mesma (Tabela 2 e 5), quando se compara o derivado S3 com o derivado S3a, o derivado S4 com o S4a e o derivado S5 com o derivado S5a. Isto pode ser atribuído ao fato que os derivados S3, S4 e S5, provenientes da galactoglucomanana de *C. ibitipocae*, que é mais ramificada, foram sulfatados nos terminais não redutoras, ou seja, nas ramificações, enquanto que os derivados S3a, S4a e S5a, provenientes da galactoglucomanana de *C. connexa* podem ter sido sulfatados nas ramificações e nas unidades de manose da cadeia principal, já que a mesma é menos ramificada e pode permitir o acesso do sulfato à cadeia principal. De acordo com esses fatos, a atividade anticoagulante pode, nestes casos, ser decorrente da sulfatação dos terminais não redutores, enquanto que talvez a sulfatação da cadeia principal não interfira nesta propriedade.

O mecanismo de ação dos heparinóides na atividade anticoagulante não é sabido ao certo. Existem relatos que as glucanas sulfatadas são capazes de inibir diretamente a ação da trombina (ALBAN *et al.*, 1995). Outra possibilidade é que como os heparinóides têm analogia funcional com a heparina, seus modos de atuação podem ser semelhantes através da ação sobre o cofator II da heparina ou sobre a AT III. Porém neste caso, causando uma ativação inespecífica da AT III (ALBAN *et al.*, 1992), culminando na inibição dos fatores de coagulação no qual a AT III atua. Não se pode descartar a possibilidade de ambos os mecanismos atuarem juntos na inibição da coagulação sanguínea (MOURÃO *et al.*, 1996).

Estudos quanto ao mecanismo de ação dos derivados sulfatados na coagulação sanguínea, *in vivo* bem como das possíveis alterações teciduais, celulares e bioquímicas ocasionadas pelo uso desses heparinóides devem ser realizados com o intuito de garantir a eficácia terapêutica e melhorar sua aplicabilidade.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- 1- As galactoglucomananas extraídas dos liquens *C. ibitipocae* e *C. connexa*, após serem submetidas aos processos seqüenciais de sulfatação, demonstraram um aumento progressivo dos valores de D.S., indicando que as reações de sulfatação ocorreram de uma maneira gradual a cada processo;
- 2- A análise dos derivados sulfatados de *C. ibitipocae* (S1 a S5) e *C. connexa* (S1a a S5a) através de RMN¹³C, demonstrou que a introdução dos grupos sulfato ocorreu preferencialmente em C-6.
- 3- A determinação da homogeneidade revelou que os derivados sulfatados de ambas galactoglucomananas são heterogêneos, sendo constituídos por populações de moléculas com massas molares diferentes;
- 4- Os testes de coagulação sanguínea, verificados pelos testes TT e APTT, demonstraram que as galactoglucomananas nativas de *C. ibitipocae* e *C. connexa* não possuem qualquer atividade anticoagulante;
- 5- Todos os derivados sulfatados de ambos os liquens apresentaram atividade anticoagulante, a qual foi dependente do aumento do D.S;
- 6- O derivado sulfatado de *C. ibitipocae* que apresentou melhor atividade anticoagulante avaliado pelo teste TT foi o derivado S5 (D.S. 1,29) e pelo teste APTT foi o derivado S4 (D.S. 1,08); para a *C. connexa*, o derivado sulfatado que apresentou melhor atividade anticoagulante foi o derivado S4a (D.S. 1,21) tanto no teste TT como no APTT.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABILDGARD, V. Highly purified antitrombin III with heparin cofactor activity prepared by disc electrophoresis. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, Oxford, v. 21, p. 89-91, 1968.
- AGNELLI, G. Pharmacological activities of heparin chains: should our past knowledge be revised? **Haemostasis**, Basel, v. 26 (suppl.2), p. 2-9, 1996.
- AHMADJAN, V.; HALE, M. E. **The lichens**. New York: Academic Press, 1993. p. 151-545.
- 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.; KRAUS, J.; FRANZ, G. Syntesis of laminarin sulfates with anticoagulant activity. **Drug Res.**, Aulendorf, v.42 (II), n. 8, p. 1005-1008, 1992.
- ALBAN, S.; JESKE, W.; WELZEL, D.; FRANZ, G.; FARRED, J. Anticoagulant and antithrombotic actions of a semisynthetic β -1,3-glucan sulfate. **Thromb. Res.**, Tarrytown, v. 78, n.3, p.201-210, 1995.
- AUSTIN, R. C.; SHEFFILD, W., P.; RACHBINSKI, R. A.; BLACHMAN, M.A. The N-terminal domain of antithrombin III is essencial for heparin binding and complex-formation with, but not cleavage by, α -thrombin. **Biochem. J.**, London, v. 282, n. 2, p. 345-351, 1992.
- BARINAGA, M. Origins of the lichen fungi explored. **Science**, Washington, v. 268, n. 5216, p. 1437, 1995.
- BARREIRA, S. M. W. **Estudo comparativo de polissacarídeos e oligossacarídeos de liquens do gênero Cladonia**. Curitiba, 1999. 170 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas Universidade Federal do Paraná.
- BENGTSSON-OLIVECRONA, G.; OLIVECRONA, T. Binding of active and inactive forms of lipoprotein lipase to heparin: effects of pH. **Biochem. J.**, London, v. 226, n.4, p.409, 1985.
- BENTON, R. E.; GERSH, B. J. Cardiology for the primary care provider: Heparin-induced thrombocytopenia. **South. Med. J.**, Birmingham, v. 91, n. 2, p. 133-137, 1998.
- BICK, R. L.; FRENKEL, E. P. Clinical aspects of heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis and others side effects of heparin therapy. **Clin. Appl. Thromb. Hemost.** v. 5 (suppl. 1) S7-15, 1999.

- BIJSTERVELD, N. R.; HETTIARACHCHI, R. ; PETERS, R.; PRINS, M. H.; LEVI, M.; BULLER, H. R. Low-molecular weight heparins in venous and arterial thrombotic disease. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v. 82 (suppl. 1), p. 139-147, 1999.
- BJÖRK, L.; LINDHAL, U. Mechanism of the anticoagulant action of heparin. **Mol. Cell. Biochem.**, Dordrecht, v. 48, p. 161-182, 1982.
- BJÖRK, J.; OLSON, S. T.; SHEFFER, R. G.; SHORE, J. D. Binding of heparin to high molecular weight kininogen. **Biochemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 1213-1221, 1989.
- BODE, V.; FRANZ, G. Physiological activity of new heparinoids derived from plant polysaccharides. **Arch. Pharm.**, Athens, v. 324, p. 363-365, 1991.
- BOHN, J. A.; BE MULLER, J. N. (1→3)- β -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 28, n. 1, p. 3-14, 1995.
- BOISSON-VIDAL, C.; COLLIEC-JOUALT, S.; FISCHER, A. M.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; STERNBERG, C.; DURAND, P.; JOSEFONVICZ, J. Biological activities of fucans extracted from brown seaweeds. **Drugs Future**, Barcelona, v. 16, p. 539-545, 1991.
- BOURIN, M. C.; LINDHAL, U. Glicosaminoglycans and the relation of blood coagulation. **Biochem. J.**, London, v. 289, n.2, p. 313-330, 1993.
- BRINKHOUS, K. M.; SMITH, H. P.; WARNER, E. D.; SEEGERS, W. H. The inhibition of blood clotting: an unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion of prothrombin into thrombin. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 125, p. 683-687, 1939.
- BRODY, M. T.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. D.; NEU, H. C. **Farmacologia humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 245.
- BROZE, G. J.; WARREN Jr, L. A.; NOVOTNY, W. F.; HIGUCHI, D. A.; GIRALD, J. J., MILETICH, J. P. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor Xa: insight into its possible mechanism of action. **Blood**, Philadelphia, v. 71, p. 335-343, 1988.
- CANAANI, O.; RONEN, R.; GARTY, J.; CAHEN, D.; MALKIN, S.; GALUN, M. Photocustic study of the green alga *Trebouxia* in the lichen *Ramalina duriae* in vivo. **Photosynthesis Res.**, Dordrecht, v. 5, p. 297-306, 1984.
- CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. **Atividade antitumoral dos polissacarídeos nativos e quimicamente modificados do líquen *Ramalina celastri***. Curitiba, 1998. 147 f. Tese

(Doutorado em Bioquímica)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; BUCHI, D. F.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. M. Cytotoxic effect against HeLa cell of polysaccharides from the lichen *ramalina celastri*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 503-509, 1997.

CASSARO, C. M.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 252, n. 7, p. 2254-2261, 1977.

CASU, B. Structure and biological activity of heparin. **Adv. Carbohydr. Chem. Bioch.**, San Diego, v. 43, p. 51-134, 1985.

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

CHURCH, I. C.; MEADE, J. B.; TREANOR, R. E.; WHINNA, H. C. Antithrombotic activity of fucoidan. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 264, n. 6, p. 3618-3623, 1989.

COLLIEC, S.; FISCHER, A. M.; TAPON- BRETAUDIÈRE, J.; BOISSON, C. ; DURAND, P. JOZEFONVICZ, J. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. **Thromb. Res.**, Tarrytown, v. 64, p. 143-154, 1991.

COSMI, B.; HIRSH, J. Low molecular weight heparins. **Curr. Opin. Cardiol.**, Philadelphia, v. 9, n. 5, p. 612-618, 1994.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, Washington, v. 145, n. 3637, p. 1310, 1964.

DAWES, J. Interactions of heparins in the vascular environment. **Haemostasis**, Basel, v. 23, p. 212-219, 1993.

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. **Semin. Thromb. Hemostasis**, New York, v. 17, p. 65-73, 1991.

DIETRICH, C. P.; PAIVA, J. F.; CASTRO, R. A. B; CHAVANTE, S. F.; JESKE, W.; FAREED, J.; GORIN, P. A. J; MENDES, A.; NADER, H. B. Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Pnaeus brasiliensis*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1428, n. 2, p.273-283, 1999.

- DOCTOR, V. M.; ESHO, D. Studies, by ^{13}C -n.m.r and ^1H -m.n.r spectroscopy of polysaccharide structure following sulfatation. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 121, p. 312-315, 1983.
- DOCTOR, U. M.; LEWIS, D.; COLEMAN, M.; KEMP, M. T.; MARBLEY, E.; SAULS, V. Anticoagulant properties of semisynthetic polysaccharide sulfates. **Thromb. Res.**, Tarrytown, v. 64, p. 413-425, 1991.
- DODGSON, K. S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymatics and non-enzymatics hydrolysis of carbohydrates and other sulphate esters. **Biochem. J.**, London, v. 78, n. 2, p.312-319, 1961.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G.. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem. J.**, London, v. 84, n.1, p.106-110, 1962.
- DOOLITTLE, R. F. Fibrinogen and fibrin. **Ann. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 53, p. 195-229, 1984.
- EDENS, R. E.; FROMM, J. R.; FROMM, S. J.; LINHARDT, R. J.; WEILER, J.M. Two-dimensional affinity resolution electrophoresis demonstrates that three distinct heparin populations interact with antithrombin III. **Biochemistry**, Washington, v. 34, n. 8, p. 2400-2407, 1995.
- ELIX, J. A. Biochemistry and secondary metabolites. In: NASH III, T.H. **Lichen biology**. Cambridge: University Press, 1996, p. 155-180.
- 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**, Amsterdam, v. 870, n. 1, p. 92-101, 1986.
- FABRIS, F.; LUZZATO, G.; STEFANI, P. M.; GIROLAMI, B.; CELLA, G.; GIROLAMI, A. Heparin-Induced thrombocytopenia. **Haematologica**, Roma, v. 85, n. 1, p. 72-81, 2000.
- 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. Biophys.**, Orlando, v. 347, n. 1, p. 19-29, 1997.
- FISCHBACH, D. D.; FOGDALL, R. P. **Coagulación**. Buenos Aires: Editora Médica Panamericana, 1985. p. 14-264.
- GALLUS, A. S.; HIRSH, J. Antithrombotic Drugs: Part I. **Drugs**, Auckland, v. 12, p. 41-68, 1976.

GERMANO, S. **Heparinóides produzidos por modificação química em galactomananas de sementes de *Cássia fastuosa* Willd. e *Mimosa scrabellula* Betham.** Curitiba, 1996. 84 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GEROTZIAFAS, G. T.; BARA, L.; BLOCH, M. F. et al. Treatment with LMWHs inhibits factor VIIa generation during in vitro coagulation of whole blood. **Thromb. Res.**, Tarrytown, v. 81, p. 491-496, 1996.

GORIN, P. A. J.; BARRETO-BERGTER, E. M.; CRUZ, F. S. Chemical structure of galacto-D-mannan component of *Trypanossoma cruzi*: C- 13 N. M. R. shift dependence of D-galactose to D-mannose linkage. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 88, n.2, p. 177-188, 1981.

GORIN, P. A. J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, San Diego, v. 38, p. 13-104, 1981.

GORIN, P. A. J.; BARON, M.; SILVIA, M. C. C.; TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M. Lichen carbohydrates. **Ciênc. Cultura (São Paulo)**, v. 45, n.1, p.27-36, 1993.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 128, n.1, p. 119-132, 1984.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural diversity of D-galacto-D-mannan componentes isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 142, n.2, p.253-267, 1985.

GORIN, P. A. J.; MAZURECK, M. Assignment of carbon -13 signals in nuclear magnetic resonance spectra of D-galactopyrano- α -D-mannopyranans from yeasts. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 105, n.2, p. 283-287, 1982.

GORIN, P. A. J.; MAZURECK, M. Further studies on the assignment of signals in 13 C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 53, n. 8, p. 1212-1223, 1975.

GRAUFFEL, V.; KLOAREG, B.; MABEAU, S.; DURAND, P.; JOZEFONVICZ, J. New natural polysaccharides with potent antithrombotic activity fucans from brown algal. **Biomaterial**, Oxford, v. 10, p. 363-368, 1989.

GREEN, D. Current trends in the use of heparins in thromboprophylaxis. **Semin. Thromb. Hemostasis.**, New York, v. 25 (suppl.1), p. 29-35, 1999.

GRIFFITH, G. C.; NICHOLS Jr, G.; ASHER, J. D.; FLANAGAN, B. Heparin osteoporosis. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v. 193, p. 85-94, 1965.

- GRIFFITH, M. J. Heparin- catalyzed inhibitor/protease reactions: kinetic evidence for a common mechanism of action of heparin. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 80, n. 18, p. 5460-5465, 1983.
- GUNAY, N. S.; LINHARDT, R. J. Heparinoids: Structure, biological activities and therapeutic applications. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 65, n. 4, p. 301-306, 1999.
- HAINES, A. W. Relative reactivities of hidroxyl groups in carbohydrates. **Adv. Carbohydr. Chem.**, New York, v. 33, p. 11-110, 1976.
- HALE, M. E. **How to know the lichen**. 2.ed. Iowa: Brown Company Publishers, 1979.
- HALE, M. E. **The biogoly of lichens**. Baltimore: Edwards Arnold, 1983.
- HALL, L. D.; JOHNSON, L. F. Chemical studies by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy: some chemical shift dependencies of oxygenated derivatives. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, Cambridge, p. 509-510, 1969.
- HAYAISHI, M.; YAMADA, K. M. Divalent cation modulation of fibronectin binding to heparin and to DNA. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 257, n. 9, p. 5263-5267, 1982.
- HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; SAKURAGAWA, N. Selective activation of heparin cofactor II by a sulfated polysaccharide isolated from leaves of *Artemisia princeps*. **Blood Coagul. & Fibrinolysis.**, Oxford, v. 6, n. 7, p. 643-649, 1995.
- HIRATA, A. ; ITOH, W.; TABATA, K.; KOJIMA, T.; ITOYAMA, S.; SUGAWARA, I. Anticoagulant activity of sulfated schizophyllan. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v. 58, n. 2, p. 406-407, 1994.
- HIRSH, J. Anticoagulant therapy. **American Hospital Supply Corporation**, p. 1-26, 1985.
- HIRSH, J.; FUSTER, V. Guide to anticoagulant terapy. Part 1: heparin. **Circulation**, Dallas, v. 89, n. 3, p. 1449-1468, 1994.
- HOFFMAN, J.; LARM, O.; LARSSON, K. Studies on the blood-anticoagulant activity of sulphated polysaccharides with different uronic acid content. **Carbohydr. Polym. barking**, v. 2, n. 2, p. 115-121, 1982.
- HONDA, N. L.; VILEGAS, W. **A química dos líquens**. Química Nova: São Paulo, v. 21, n.6, p.110-125, 1998.

- HORNER, A. A.; YONG, E. A symmetric distribution of sites with high affinity for antitrombin III in rat skin heparin proteoglycan. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 257, n. 15, p. 8749-8754, 1982.
- IACOMINI, M.; SCHNEIDER, C. L.; GORIN, P. A. J. Comparative studies on the polysaccharides of *Cladonia alpestris* (Reindeer moss), *Cladonia confusa*, and *Cladonia amaurocacia*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 142, n.2, p. 237-251, 1985.
- JAQUES, L.B. Heparins-anionic polyelectrolyte drugs. *Pharmacolo. Rev.*, Baltimore. v. 31, p. 99-166, 1980.
- JOLY, A. B. *Introdução à taxonomia vegetal*. 2. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1975. p. 100-106.
- 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.*, Baltimore, v. 261, n. 1, 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.*, Baltimore, v. 255, n. 21, p. 10081-10090, 1980.
- KELTON, J. G. Heparin induced thrombocitopenia. *Haemostasis.*, Basel, v. 16, p. 173-186, 1986.
- LANE, D. A.; FLYNN, A. M; PEJLER, G. LINDAHL, U.; CHOAY, J. ; PREISSER, K. structural requirements for the neutralization of heparin-like saccharides by complement S protein/vitronectin. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 262, n. 34, p. 16343-16348, 1987.
- LARM, O.; LARSSON, K.; SCHOLANDER, E. The preparation of a heparin analoge from alginic acid. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 73, p. 332-336, 1979.
- LAWSON, J. G.; BUTENAS, S.; RIBARICK, N. MANN, K. G. Complex-dependent inhibition of factor VIIa by antithrombin III and heparin. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 268, n. 2, p. 767-770, 1993.
- LEE, G. R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. *Wintrobe's clinical hematology*. 9. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- LEITE, E. L.; MADEIROS, M. G. L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; SILVA, L. F.; CHAVANTE, S. F.; ABREU, L. D.; DIETRICH, C. P. ; NADER, H. B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xilofucoglucurana from the alga *Spatoglossum schroderi*. *Plant Scienc. (Shannon)*, Amsterdam, v. 132, n. 2, p. 215-228, 1998.
- LIMA , A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J. R. *Métodos de laboratório aplicados à clínica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

LINDHAL, U. L.; THUMBERG, G.; BACKSTROM, J.; RIESENFIELD, K.; NORDLING, I.; BJORK, I. Extension and structural variability of the antithrombin-binding sequence in heparin. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 259, n. 20, p. 12368-12376, 1984.

LINHARDT, R. G.; TOIDA, T. **Carbohydrates drugs - heparin oligosacarides - new analogs development and applications.** IN: WITZAK, Z. B. ; NIEFORT K.A. Marcel Dekker: New York. 1997, p. 707-774.

LINHARES, S.; GEWANDSZAIDER, F. **Biologia.** 4. ed. São Paulo: Ed. Ática, 1985. p. 119-122.

Mac FARLANE, R. G. An enzime cascade in blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature (London)*, v. 202, n. 4931, p.498, 1964.

MacFARLANE, L. L.; WEART, C. W. An introduction to low-molecular-heparins and their use in the tratament of deep venous thrombosis. *Am. J. Ther.*, v. 2, n. 8, p. 569-580, 1995.

MAJERUS, P.M.; BROZE Jr., G. J.; MILITICH, J. P.; TOLLESFSEN, D. M. drogas anticoagulants trombolíticas e antiplaquetárias. In: GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S., TAYLOR, D. **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapia.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 874-886.

MARTIN, S. **Galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*: estrutura, modificações e propriedades.** Curitiba, 1999. 91 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MAURAY, S.; STERNBERG, C.; THEVENIAUX, J.; MILLET, J.; SINQUIN, C.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; FISCHER, A. M. Venous antithrombotic and anticoagulant activities of a fucoidan fraction. *Thromb. Haemostasis.*, stuttgart, v. 74, p. 1280-1285, 1995.

MITSUYA, H.; LONEY, D. J.; KUNO, S.; UENO, R.; WONG-STAAL, F.; BRODER, S. Dextran sulphate suppression of viruses in the HIV family: inhibition of virion binding to CD4⁺ cells. *Science*, Washington, v. 240, n. 4852, p.646-649, 1988.

MOURÃO, P. A. S.; GUIMARÃES, M. A. M; MULLOY, B.; THOMAS, S.; GRAY, E. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. *Br. J. Haematol.*, Oxford, v. 101, p. 647-652, 1998.

MOURÃO, P. A. S; PEREIRA, M. S.; PAVÃO, M. S. G.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D. M.; MOWINCKEL, M. C.; ABILDGARD, U. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 271, n. 39, p. 23973-23984, 1996.

MUELLER, R.; SCHEIDT, S. History of drugs for thrombotic disease. Discovery, development, and directions for the future. **Circulation**, Dallas, v. 89, n. 1, p. 432-449, 1994.

MULLOY, B.; RIBEIRO, A. C. ALVES, A. P.; VIEIRA, R. P.; MOURÃO, P. A. S. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the O-2 and O-4 positions. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, n. 35, p. 22113-22123, 1994.

NADER, H. B.; DIEDRICH, 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.

NAKAMURA, S.; SAKURADA, S.; SALAHUDDIN, S. Z.; ASADA, Y.; TANAKA, N.G.; SAKAMOTO, N.; SEKICHI, M.; GALLO, R. C. Inhibition of development of Kaposi's sarcoma - related lesions by a bacterial cell wall complex. **Science**, Washington, v. 255, n. 5050, p. 1437-1440, 1992.

NISHINO, T.; AIZU, Y.; NAGUMO, T. the relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulphates from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.55, p. 791-796, 1991a.

NISHINO, T. AIZU, Y.; NAGUMO, T. Antithrombin activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurona*. **Thromb. Res.**, Tarrytown v. 62, p. 765-773, 1991c.

NISHINO, T., NAGUMO, T. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 229, n. 2, p. 335-362, 1992.

NISHINO, T.; AIZU, Y.; NAGUMO, T. The influence of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity. **Thromb. Res.**, v. 64, p. 723-731, 1991b.

NISHINO, T.; TAKABE, Y.; NAGUNO, T. Isolation and partial characterization of a novel β -D_galactana sulfate from the brown seaweed *Laminaria angustata* var. *longissima*. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 23, n. 3, p. 165-173, 1994.

O'NEILL, A. N. Sulphated derivatives of laminarin. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 33, p. 1097-1101, 1955.

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.**, Baltimore, v. 261, p. 13151-13159, 1986.

- PATANKAR, M. S.; OEHNINGER, S.; BARNETT, T.; WILLIANS, R. L.; CLARK, G. F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 268, n. 29, p. 21770-21776, 1993.
- PEREIRA, E. C.; NASCIMENTO, S. C.; LIMA, R. C.; SILVA, N. H.; OLIVEIRA, A. F. M.; BANDEIRA, E.; BOITARD, M.; BERIEL, H.; VICENT, C.; LEGAZ, M. E. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, Tokyo, v. 19, n. 112, p. 47-52, 1994.
- PEREIRA, M. S.; MULLOY, B. MOURÃO, P. A. S. structure and anticoagulant activity of sulfated fucans: Comparison between the regular repetitive and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algal. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 274, n. 12, p. 7656-7667, 1999.
- 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.*, Baltimore, v. 262, n. 16, p. 7567-7574, 1987.
- PETITOU, M.; LORMEAU, J. C.; PERLY, B.; BERTHAULT, D.; BOSSENEC, V.; SIÈ, 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.
- PHILIPP, B.; NEHLS, I. WAGENKNECHT, W.; SCHANABELRAUCH, M. ¹³C-r.m.n. spectroscopic study of the homogeneous sulphation of cellulose and xylan in the N2O4-DMF system. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 164, p. 107-116, 1987.
- PIRES, L. **Análogos funcionais da heparina**. Curitiba, 1998. 93 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- PLETCHER, C. H.; NELSESTUEN, G. L. Two-substrate reaction model for heparin-catalysed bovine antithrombin/protease reaction. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 258, n. 2, 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 protein S with heparin. *Eur. J. Biochem.*, Berlin, v. 156, p. 645-650, 1986.
- RAZI, N.; FEYZ, E.; BJÖRK, J.; NAGGI, A.; CASU, B.; LINDHAL, V. Structural and functional properties of heparin analogues obtained by chemical sulfation of *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharides. *Biochem. J.*, London, v. 309, n. 2, p. 465-472, 1995.
- REINHOLD, V. N.; CARR, S. A.; GREEN, B. N.; PETITOU, M.; CHOAY, J.; SINAY, P. Structure characterization of sulfated glycosaminoglycans by fast atom bombardment

mass spectrometry: application to heparin fragments prepared by chemical synthesis. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 161, n. 2, p. 305-313, 1987.

REJ, R. N.; LUDWIG-BAXTER, K. G.; PERLIN, A. S. Sulphation of some chemically-modified heparins formation of a 3-sulfate analog of heparin. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 210, p. 299-310, 1991.

ROSEMBERG, R. D.; BAUER, K. A. The heparin-antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism. In: COLMAN, R. W.; HIRSH, J. MARDER, V. J.; SALZMAN, E. W. **Hemostasis and Thrombosis - Basics principles and clinical practice**. 3. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1994. p.837-860.

SAMANA, M. M.; BARA, L.; GOUIN-THIBAULT, I. New data on the pharmacology of heparins. **Drugs**, Auckland, v. 52 (Suppl. 7), p. 8-15, 1996.

SCULLY, M. F.; KAKKAR, V. V. The antiheparin effect of a heparinoid, pentosan polysulphate. **Biochem. J.**, London, v. 218, n. 3, p. 657-665, 1984.

SHING, Y.; FOLKMAN, J.; SULLIVAN, R.; BUTTERFIELD, C.; MURRAY, J. KLAGSBRUN, M. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. **Science**, Washington, v. 223, n. 4642, p. 1296-1298, 1984.

SIDDHANTA, A. K. ; SHANMUGAM, M.; MODY, K. H.; GOSWAMI, A. M.; RAMAVAT, B. K. Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs from the west coast of india: chemical composition and blood coagulant. **Int. J. Biol. Macromol.**, Oxford, v. 26, p. 151-154, 1999.

SIÉ, P. OFOSU, F. FERNANDEZ, F.; BUCHNAN, M. R. PETITOU, M.; BONEU, B. Respective role of antithrombin III and Heparin cofactor II in the in vitro anticoagulant effects of heparin and various sulfated polysaccharides. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v. 64, p. 707-714, 1989.

SILVER, D.; KAPC, D. N; TSOI, E. K. M. Heparin-induced thrombocytopenia, thrombosis and hemorrhage. **Ann. Surg.** v. 198, p. 301-305, 1983.

SONE, Y.; ISODA-JOHMURA, M.; MISAKI, A. Isolation and chemical characterization of polysaccharides from *Iwatake*, *Gyrophora esculenta* Miyoshi. **Biosci. Biootechnol. Biochem.**, v. 60, n. 2, p. 213-215, 1996.

SOUZA-LIMA, M. M. **Polissacarídeos nativos e modificados das sementes de *Hymenaea courbaril*.** Curitiba, 1997. 128 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

- SPRINGER, G. F.; WURZEL, H. A.; Mc NEAL, G. M.; ANSELL, N. J.; DOUGHTY, M. F. Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidin. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Baltimore, v. 94, p. 404-409, 1957.
- STUELPE, P.M. **Atividade de α - e β -D-glucanas extraídas do líquen *Ramalina celastri* modificadas quimicamente**. Curitiba, 1997. 114 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- TAVARES, G. A. **Estrutura e propriedades físico-químicas da galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa* Willd (Cassia)**. Curitiba, 1994. 80 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- TOLLEFSEN, D. M.; MARJEUS, D. W.; BLANK, M. K. Heparin cofactor II. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 257, p. 2162-2169, 1982.
- 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.**, Baltimore, v. 272, n. 18, p. 12024-12029, 1997.
- TURVEY, J. R. Sulfates of the simple sugars. **Adv. Carbohydr. Chem.**, New York, v. 20, p. 183-218, 1965.
- TYRREL, D. J.; KILFEATHER, S.; PAGE, C. P. Therapeutic use of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant. **Trends Pharmacol. Sci.**, Cambridge, v. 16, p. 204, 1995.
- UCHIYAMA, H.; METORI, A.; OGAMO, A.; NAGASAWA, K. Contribution of chemical 6-O-sulfation of the aminodeoxyhexose residues in whale heparin with high affinity for antithrombin III to its anticoagulant properties. **J. Biochem.**, v. 107, n. 3, p. 377-380, 1990.
- UEHARA, T.; TAKESHITA, M.; MAEDA, M. Studies on anticoagulant-active arabian sulfate from the green alga, *Codium latum*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 224, p. 201-208, 1992.
- VANDERMEULEN, E. P.; AKEN, H. V.; VERMYLEN, J. Anticoagulants and spinal-epidural anesthesia. **Anesth. Analg.**, Baltimore, v. 79, p. 1165-1177, 1994.
- WARKENTIN, T. E.; BARKIN, R. L. NEWER strategies for treatment of heparin-induced thrombocytopenia. **Pharmacotherapy**, Boston, v. 19, n. 2, p. 181-195, 1999.
- WARN-CRAMER, B. J.; RAO, L. V. M.; MAKI, S. L. RAPAPORT, S. I. Modifications of extrinsic pathway inhibitor (EPI) and factor Xa that affect their ability to interact and to

inhibit factor VIIa/tissue factor: evidence for a two-step model of inhibition. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart v. 60, p. 453-456, 1988.

WEILER, J. M.; EDENS, R. E.; LINHARDT, R. J.; KAPELANSKI, D. P. Heparin and modified heparin inhibit complement activation in vivo. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 148, n.10, p. 3210-3215, 1992.

WELLSTEIN, A.; ZUGMAIER, G.; CALIFANO III, J.A.; KERN, F.; PAIK, S.; LIPPMAN, M. E. Tumor growth dependent on Kaposi's sarcoma-derived fibroblast growth factor inhibited by pentosan polysulfate. **J. Nat. Cancer. Inst.** Bethesda, v. 83, p. 716-720, 1991.

WHISTLER, R.L.; BUSHWAY, A.; SINGH, P. P.; NAKAHARA, W.; TOKUZEN, R. Noncytotoxic antitumor polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, San Diego, v. 32, p. 235-275, 1976.

WHISTLER, R. L.; SPENCER, W. W. sulfation. **Meth. Carbohydr. Chem.**, New York, v. 4, p. 297-298, 1964.

XAVIER-FILHO, L.; RIZZINI, C. T. **Manual de liquenologia brasileira**. 1. ed. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1976.

ZYNGIER, S.; FORTES, Z. B. Ensaio biológicos. In: CORBETT, C. E. **Farmacodinâmica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 37-45.