

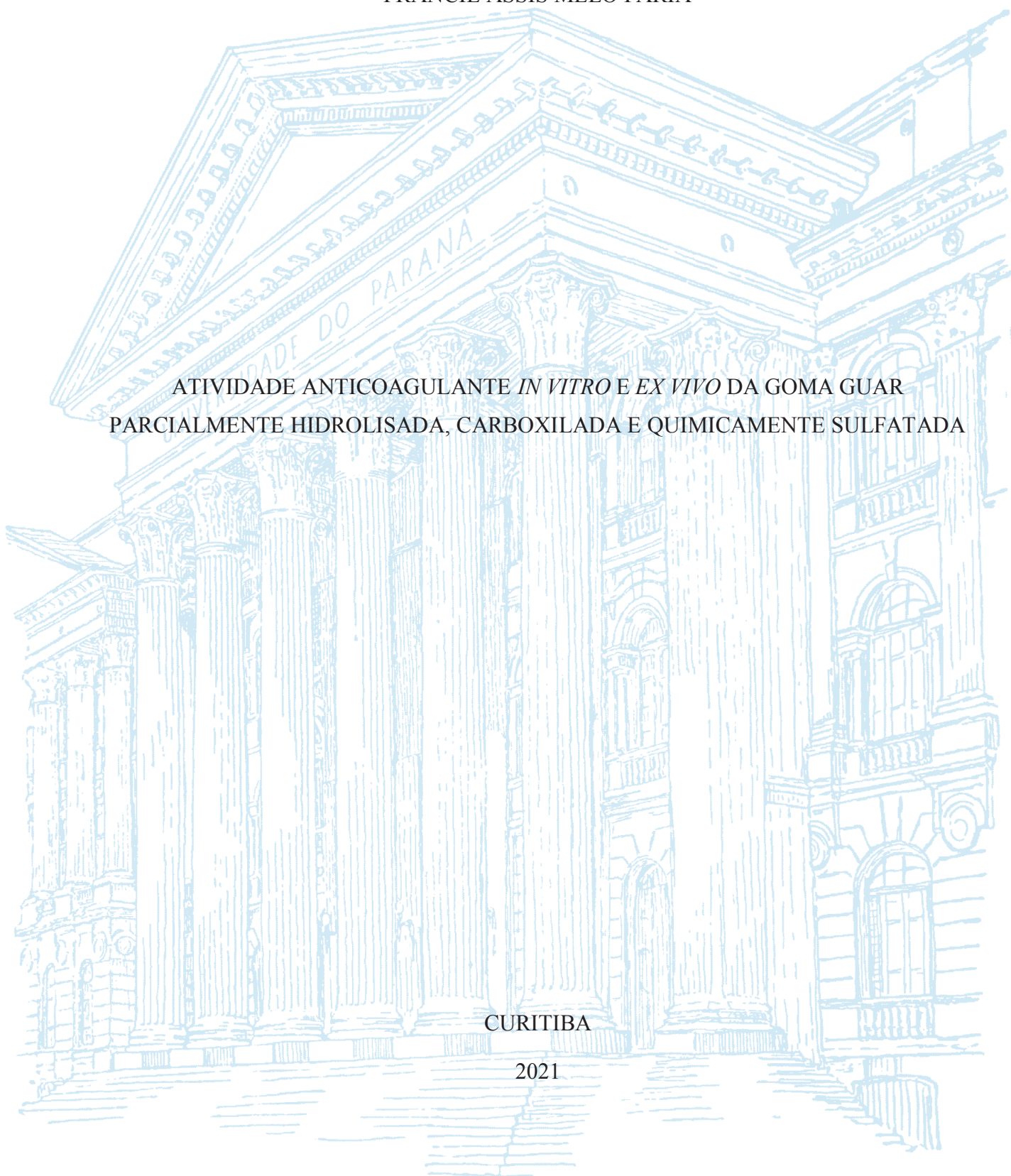
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIÊ ASSIS MELO FARIA

ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *IN VITRO* E *EX VIVO* DA GOMA GUAR
PARCIALMENTE HIDROLISADA, CARBOXILADA E QUIMICAMENTE SULFATADA

CURITIBA

2021



FRANCIÊ ASSIS MELO FARIA

ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *IN VITRO* E *EX VIVO* DA GOMA GUAR
PARCIALMENTE HIDROLISADA, CARBOXILADA E QUIMICAMENTE SULFATADA

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

Orientador: Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani.

Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti.

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Faria, Franciê Assis Melo.

Atividade anticoagulante *in vitro* e *ex vivo* da goma guar parcialmente hidrolisada, carboxilada e quimicamente sulfatada. / Franciê Assis Melo Faria. – Curitiba, 2021.

80 f. : il.

Orientador: Thales Ricardo Cipriani.

Coorientador: Diogo Ricardo Bazan Ducatti.

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

1. Heparina. 2. Anticoagulantes. 3. Sulfatos. 4. Tempo. 5. Ácidos. 6. Polissacarídeos. I. Título. II. Cipriani, Thales Ricardo. III. Ducatti, Diogo Ricardo Bazan. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 615.718



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FRANCIÊ ASSIS MELO FARIA** intitulada: **Atividade anticoagulante *in vitro* e *ex vivo* da goma guar parcialmente hidrolisada, carboxilada e quimicamente sulfatada**, sob orientação do Prof. Dr. THALES RICARDO CIPRIANI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 09 de Julho de 2021.

Assinatura Eletrônica

14/07/2021 08:18:25.0

THALES RICARDO CIPRIANI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

22/07/2021 15:21:04.0

MARCELLO IACOMINI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

19/07/2021 14:35:53.0

YONY ROMÁN OCHOA

Avaliador Externo (PURDUE UNIVERSITY)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho, primeiramente, à minha decisão e esforço de cultivar meus estudos. Mas dedico, principalmente, à todas as pessoas que me apoiaram e me ofereceram todo carinho, atenção, alegrias e que estavam ao meu lado durante esse período.

Aos meus pais por serem os melhores pais que eu poderia imaginar. O incentivo, consentimento e compreensão de vocês foram essenciais para eu finalizar essa etapa. Agradeço a oportunidade de ter sido criada por pessoas tão especiais. Deus sabe como eu me sinto abençoada por tê-los em minha vida.

Às minhas irmãs, minhas eternas amigas, que eu não consigo me imaginar longe. Obrigada por serem tão compreensíveis e parceiras, ao ouvir e me aconselhar sempre que eu precisava. Vocês duas são um presente que recebi da vida e que ajudaram para que meus dias fossem mais leves e alegres.

Ao meu sobrinho lindo e fofo que me inspira a ser leve, alegre e a desconectar das preocupações da vida. Você mesmo sem saber é um ensinamento vivo que me mostra o valor da vida, da família e do amor. Obrigada querido por mesmo tão pequeno ser um enorme motivo do porquê sou uma pessoa feliz.

Ao meu noivo, que sempre esteve ao meu lado, me incentivando e me apoiando. Você foi e é para mim uma segurança de que não importa o que aconteça tudo vai ficar bem. Obrigada por ser esse companheiro e aliado tão compreensível. Agradeço também à sua família. Eu jamais iria imaginar que a família que eu já tinha poderia ser somada de pessoas tão especiais como vocês.

Aos meus avós que sempre me incentivaram a buscar e me esforçar pelos meus estudos. Vocês são para mim uma inspiração de vida. Espero construir minha família com todo amor, dedicação e sabedoria de vocês.

Aos meus amigos que com certeza me ajudaram a tornar meus dias mais alegres, descontraídos e cheio de risadas e brincadeiras. À Carina Boaron, que, particularmente, fez parte de anos da minha vida antes mesmo do Mestrado e foi motivo de inspiração para ingressar no Programa. Obrigada por fazer parte disso tudo na minha vida, sua amizade é muito importante para mim. Além disso, agradeço também em especial, àqueles que faziam

parte do dia-dia do laboratório. Não teria como imaginar que eu iria encontrar pessoas tão solícitas, divertidas, amigas e queridas. Com certeza, a lembrança de que o grupo de pesquisa de Química de Carboidratos é formado por alunos incríveis como vocês vai ficar em mim para sempre.

Aos meus amigos caninos, Tody e Luke, companheiros das minhas tardes de estudo.

Agradeço ao Professor e Orientador Thales Ricardo Cipriani, que desde meus anos de graduação esteve me ensinando e orientando. Você é um exemplo para mim, tanto de professor como de pessoa. Agradeço também ao Professor Diogo Ricardo Bazzan Ducatti, que também me acompanhou durante graduação, sendo banca do meu TCC. Agradeço por todo apoio, solicitude e sabedoria.

Por fim, agradeço à Deus pela oportunidade de viver tudo isso. Em meio à tantas dificuldades atuais, todo esse amor e apoio que recebi na minha vida, com certeza, é uma benção para mim e eu não poderia deixar de valorizar e reconhecer o Autor disso tudo.

NOTA EXPLICATIVA

Esta dissertação está estruturada na forma de artigo segundo as normas do Programa de Pós Graduação em Ciências – Bioquímica e do Sistema de Bibliotecas (SiBi) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A dissertação contém introdução, revisão bibliográfica, justificativa, objetivos, artigo científico, conclusões, referências e anexos. O artigo científico inclui introdução, materiais e métodos, resultados e discussão, conclusão e referências.

RESUMO

A heparina é um polissacarídeo naturalmente sulfatado e rico em ácidos urônicos, muito utilizado por promover ação anticoagulante e antitrombótica. Apesar da sua importância, esta apresenta algumas desvantagens como o seu alto custo, efeitos colaterais e risco de contaminação. Estudos de anticoagulantes alternativos baseados em polissacarídeos têm sido desenvolvidos. Muitas destas moléculas são isoladas de plantas, fungos, algas e animais. A goma guar é um polissacarídeo de planta, do tipo galactomanana não carboxilada, que quando hidrolisada e sulfatada apresenta atividade anticoagulante. No entanto, não se conhece o efeito de ácidos urônicos, que podem ser obtidos pela oxidação da goma guar, sobre a sua atividade. Portanto, este trabalho buscou avaliar se a presença de ácidos urônicos na goma guar parcialmente hidrolisada e quimicamente sulfatada contribuiria na ação anticoagulante. Dessa maneira, a goma guar nativa (GG) passou pelo processo de hidrólise ácida parcial, dando origem a GGH ($M_w = 1.47 \times 10^4 \text{g/mol}$). Análises de metilação e HSQC confirmaram a estrutura de galactomanana. GGH foi oxidada em um sistema tampão pH 10 utilizando o oxidante 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO) e o co-oxidante ácido tricloroisocianúrico (TCCA), gerando frações com baixo grau de oxidação (GGHOP) e com alto grau de oxidação (GGHOT). Todas as frações foram quimicamente sulfatadas e os derivados avaliados para atividade anticoagulante utilizando ensaios de aPTT, PT e TT. As frações oxidadas e sulfatadas mostraram que a atividade anticoagulante foi inversamente proporcional ao grau de oxidação. No entanto, o derivado sulfatado não oxidado GGHS1 mostrou melhor atividade anticoagulante do que a enoxaparina, uma heparina de baixo peso molecular. Todas as frações apresentaram modo de ação semelhante, inibindo principalmente o FIIa, especialmente na presença de antitrombina. Além disso, foram capazes de responder ao antídoto protamina ao apresentarem seu efeito anticoagulante revertido. Os resultados indicaram que a presença de ácidos urônicos (após processo de oxidação) na goma guar parcialmente hidrolisada e quimicamente sulfatada diminui sua atividade anticoagulante, comparando como potencial anticoagulante de GGHS1.

Palavras chave: Heparina. Sulfatação química. Goma guar. Carboxilação. TEMPO. Ácido urônico. Atividade anticoagulante.

ABSTRACT

Heparin is a naturally sulfated polysaccharide rich in uronic acids, widely used to promote anticoagulant and antithrombotic action. Despite its importance, it has some disadvantages such as its high cost, side effects, and risk of contamination. Studies of alternative anticoagulants based on polysaccharides have been developed. Many of these molecules are isolated from plants, fungi, algae, and animals. Guar gum is a plant polysaccharide of the non carboxylated galactomannan type, which when hydrolyzed and sulfated exhibits anticoagulant activity. However, the effect of uronic acids, which can be obtained by oxidation of guar gum, on its activity is not known. Therefore, this work sought to evaluate whether the presence of uronic acids in partially hydrolyzed and chemically sulfated guar gum would contribute to the anticoagulant action. Thus, the native guar gum (GG) underwent a process of partial acid hydrolysis, giving rise to GGH ($M_w = 1.47 \times 10^4$ g/mol). Methylation and HSQC analyses confirmed the galactomannan structure. GGH was oxidized in a pH 10 buffer system using the oxidant 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) and the co-oxidant trichloroisocyanuric acid (TCCA), generating fractions with low degree of oxidation (GGHOP) and with high degree of oxidation (GGHOT). All fractions were chemically sulfated and the derivatives evaluated for anticoagulant activity using aPTT, PT, and TT assays. The oxidized and sulfated fractions showed that the anticoagulant activity was inversely proportional to the degree of oxidation. However, the unoxidized sulfated derivative GGHS1 showed better anticoagulant activity than enoxaparin, a low molecular weight heparin. All fractions showed similar mode of action, inhibiting mainly FIIa, especially in the presence of antithrombin. Furthermore, they were able to respond to the protamine antidote by having their anticoagulant effect reversed. The results indicated that the presence of uronic acids (after oxidation process) in partially hydrolyzed and chemically sulfated guar gum decreases its anticoagulant activity compared to the anticoagulant potential of GGHS1.

Keywords: Heparin. Chemically sulfation. Guar gum. Selective oxidation. TEMPO. Uronic acid. Anticoagulant activity.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – MODELO CLÁSSICO DA CASCATA DE COAGULAÇÃO.....	23
FIGURA 2 – FASES DO MODELO DE COAGULAÇÃO BASEADO EM CÉLULAS.....	25
FIGURA 3 – ESTRUTURA DA HEPARINA.....	31
FIGURA 4 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ELEMENTOS OBTIDOS A PARTIR DO PROCESSO DE OXIDAÇÃO COM O REAGENTE TEMPO.....	37
FIGURA 5 - MECANISMO PROPOSTO DE OXIDAÇÃO PELO SISTEMA TEMPO/TCCA.....	38
FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DA GOMA GUAR.....	39

ARTIGO I

FIGURE 1 - SCHEME OF OBTAINED FRACTIONS AFTER HYDROLYSIS, OXIDATION AND SULFATION PROCESS.....	54
FIGURE 2 - HPSEC ELUTION PROFILE AND MW OF THE NATIVE FRACTION AND DERIVATIVES OBTAINED AFTER HYDROLYSIS (A), OXIDATION (B) AND SULFATION (C).....	55
FIGURE 3 – $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ - HSQC – DEPT SPECTRUM IN D_2O , AT 70°C , OF THE NATIVE FRACTION AND DERIVATIVES.....	56
FIGURE 4 – EFFECT OF THE SULFATED POLYSACCHARIDES ON aPTT OF CITRATED SHEEP PLASMA.....	60
FIGURE 5 – EFFECT OF THE SULFATED POLYSACCHARIDES ON PT (A) AND TT (B) OF CITRATED SHEEP PLASMA.....	62
FIGURE 6 – EFFECT OF GGHS1, GGHOPS2 AND GGHOTS2 ON FIIa (A and B) and FXa (C) ACTIVITIES.....	63
FIGURE 7 – EFFECT OF PROTAMINE ON THE ANTICOAGULATION ACTIVITY OF GGHS1, GGHOPS2 AND GGHOTS2.....	66
FIGURE 8 – <i>EX VIVO</i> APTT AFTER SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF GGHS1.....	67

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

TABLE 1 - $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ - HSQC CHEMICAL SHIFTS OF GGH, GGHOT AND GGHOP EXPRESSED AS δ (PPM).....	53
TABLE 2 – CONDITIONS OF PARTIAL ACID HIDROLYSIS OF GG.....	57
TABLE 3 – SELECTED OXIDATION REACTING USING GUAR GUM AS SUBSTRATE.....	58
TABLE 4 – CHEMICAL SULFATION OF GGH AND OXIDIZED FRACTIONS.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E TERMOS

Técnicas e termos associados às técnicas e métodos de análise

RMN	- <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Ressonância Magnética Nuclear)
DOx	- <i>Oxidation degree</i> (Grau de oxidação)
DS	-Degree of Substitution (Grau de substituição)
GC-MS	- <i>Gas Chromatographic-Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas)
HSQC	- <i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Correlação Heteronuclear Quântica Simples)
M _w	- <i>Molecular weight</i> (Massa Molecular)
M _m	- <i>Weighted mean of molecular weight of the monosaccharides in the polysaccharide</i> (Média ponderada da massa molecular dos monossacarídeos no polissacarídeo)
m/z	- <i>Mass/charge ratio</i> (Relação massa/carga)
ANOVA	- <i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
SEM	- <i>Standar Error of the Mean</i> (Error Padrão da Média)

Ensaio de coagulação sanguínea e termos associados relevantes

aPTT	- <i>Activated Partial Thromboplastin Time</i> (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada)
AT	- <i>Antithrombin</i> (Antitrombina)
EPCR	- <i>Endothelial protein C receptor</i> (Receptor expresso no endotélio celular)
FWW	- <i>von Willebrand Factor</i> (Fator de Von Willebrand)
FXa	- <i>Factor Xa</i> (Fator Xa)
FIIa	- <i>Factor IIa or thrombin</i> (Fator IIa ou trombina)
FT	- <i>Tecidual fator</i> (Fator tecidual)
HCII	- <i>Heparin Cofactor II</i> (Cofator II da Heparina)
GAGs	- <i>Glycosaminoglycans</i> (Glicosaminoglicanos)
GPIIb	- <i>Surface membrane protein of platelets Iba</i> (Glicoproteína de

	superfície plaquetária Iba)
GPIIb-IIIa	- <i>Surface membrane protein of platelets IIB-IIIa</i> (Glicoproteína de superfície plaquetária IIB-IIIa)
IFT	- <i>Antagonist tissue Factor pathway inhibitor</i> (Inibidor da via do Fator tecidual)
LMWH	- <i>Low Molecular Weight Heparin</i> (Heparina de Baixa Massa Molar)
PT	- <i>Prothrombin Time</i> (Tempo de Protrombina)
PC	- <i>Protein C</i> (Proteína C)
OS	- <i>Protein S</i> (Proteína S)
TT	- <i>Thrombin Time</i> (Tempo de Trombina)
TM	- <i>Thrombomodulin</i> (Trombomodulina)

Compostos químicos e termos associados

Ac ₂ O	- <i>Acetic anhydride</i> (Anidrido acético)
D ₂ O	- <i>Deuterated water</i> (Água deuterada)
DMF	- <i>N,N- dimetilformamide</i> (N,N- dimetilformamida)
BaCl ₂	- <i>Barium chloride</i> (Cloreto de bário)
CaCl ₂	- <i>Calcium chloride</i> (Cloreto de cálcio)
CH ₃ I	- <i>Iodomethane</i> (Iodometano)
HOAc	- <i>Acetic acid</i> (Ácido Acético)
H ₂ SO ₄	- <i>Sulfuric acid</i> (Ácido sulfúrico)
HCl	- <i>Chloridic acid</i> (Ácido clorídrico)
KBr	- <i>Potassium bromide</i> (Brometo de potássio)
MeOH	- <i>Methanol</i> (Metanol)
Me ₂ SO	- <i>Dimethyl sulfate</i> (Dimetilsulfato)
MeI	- <i>Methyl iodide</i> (Iodometano)
NaBr	- <i>Sodium bromide</i> (Brometo de sódio)
NaOH	- <i>Sodium hydroxide</i> (Hidróxido de Sódio)
NaHCO ₃	- <i>Sodium bicarbonate</i> (Bicarbonato de sódio)
Na ₂ CO ₃	- <i>Sodium carbonate</i> (Carbonato de sódio)
NaNO ₂	- <i>Sodium nitrite</i> (Nitrito de sódio)
NaN ₃	- <i>Sodium azide</i> (Azida de sódio)

NaBD ₄	- <i>Sodium borodeuteride</i> (Borodeuterio de sódio)
NaCl	- <i>Sodium chloride</i> (Cloro de sódio)
SO ₃ -pyridine	- <i>Pyridine sulfate</i> (Sulfato de piridina)
TCCA	- <i>Trichlorosuccinuric acid</i> (Ácido tricloroisucianúrico)
TEMPO	- <i>N-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpyridine</i> (N-oxil-2,2,6,6- tetrametilpiridina)
TFA	- <i>Trifluoroacetic acid</i> (Ácido trifluoroacético)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 HEMOSTASIA.....	20
2.2 COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	21
2.3 REGULAÇÃO DA COAGULAÇÃO.....	26
2.4 DISTURBIOS HEMOSTÁTICOS.....	27
2.5 MEDICAMENTOS ANTICOAGULANTES	29
2.6 HEPARINA	30
2.7 SULFATAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	33
2.8 OXIDAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	34
2.9 GOMA GUAR.....	38
3 JUSTIFICATIVA	40
4 OBJETIVOS	41
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
ARTIGO I.....	42
1. INTRODUCTION	44
2. EXPERIMENTAL.....	46
2.1 MATERIAL	46
2.2 METHODS.....	46
2.2.1 Partial Hydrolysis	46
2.2.2 Selective Oxidation	46
2.2.3 Chemical Sulfation	47
2.2.4 Structural Analysis of Polysaccharides.....	48
2.2.5 Anticoagulant Activity.....	50
2.2.6 α -Thrombin and Factor Xa Activities	51
2.2.7 Animals	51
2.2.8 <i>Ex Vivo</i> aPTT	52
2.2.9 Statistical Analysis	52
3 RESULTS AND DISCUSSION	53
3.1 PARTIAL ACID HYDROLYSIS OF GUAR GUM.....	53
3.2 SELECTIVE OXIDATION OF GUAR GUM.....	57

3.3 CHEMICAL SULFATION OF GGH AND OXIDIZED FRACTIONS	58
3.4 ANTICOAGULANT ACTIVITY AND MODE OF ACTION.....	60
3.4.1 Protamine as antidote	65
3.4.2 aPTT <i>ex vivo</i>	66
4 CONCLUSIONS	67
5 REFERENCES	68
6 CONCLUSÕES GERAIS	73
7 REFERÊNCIAS	74
ANEXO 1 – CEUA 1369	80

1 INTRODUÇÃO

A heparina é um anticoagulante utilizado há longa data, pertencente à família dos glicosaminoglicanos (GAGs), constituído por dissacarídeos contendo unidades de α -D-glucosamina e ácido urônico (α -L-idurônico ou β -D-glucurônico), sendo altamente sulfatada (POMIN, 2009). Embora muito eficaz, a heparina apresenta várias desvantagens que restringem sua utilização, como seu alto custo, efeitos adversos como risco de hemorragia e trombocitopenia, além de ser oriunda de tecido bovino e suíno (APA, 1995), trazendo preocupação com contaminação por patógenos, que pode impactar na sua fabricação e disponibilidade (CHANDARAJOTI; LIU; PAWLINSKI, 2016). Diante disso, muitos estudos têm sido feitos acerca da estrutura da heparina para aprimorar o entendimento de quais características conferem a sua ação anticoagulante. Bastantes pesquisas já comprovaram que a carga negativa dos grupamentos sulfato da heparina é essencial para a sua ação anticoagulante, abrindo caminhos para os trabalhos com polissacarídeos naturalmente ou quimicamente sulfatados (POMIN, 2009). Muitos projetos foram desenvolvidos nesta linha de pesquisa por meio de polissacarídeos naturalmente sulfatados, como aqueles extraídos de organismos marinhos (MOURÃO, 2015; POMIN, 2009), e polissacarídeos quimicamente sulfatados, obtidos a partir de polissacarídeos nativos de plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2016), frutas (LU *et al.*, 2012), sementes (BARDDAL *et al.*, 2020) e fungos (ALBAN, 2002).

Existem outros fatores que podem influenciar na atividade anticoagulante, como é o exemplo do sulfato de dermatan que, apesar de apresentar um alto teor de sulfato, não obtém resultados promissores quanto a sua atividade anticoagulante (CIANCIA; QUINTANA; CERESO, 2010). Além dos grupamentos sulfato, a heparina possui ácidos urônicos em sua estrutura, apresentando, portanto, resíduos carboxila (HOOK *et al.*, 1974). Ainda não há uma constatação de que esses resíduos tenham importância para a atividade anticoagulante de diferentes polissacarídeos, mas alguns estudos buscaram verificar relação sinérgica que eles podem possuir com os grupos sulfato (CIANCIA; QUINTANA; CERESO, 2010). A análise da ação anticoagulante da heparina sem a presença destes grupamentos carboxílicos por meio de esterificação (AGARWAL; DANISHEFSKY, 1986) e ciclos de carboxirredução (WESSEL *et al.*, 1990) demonstraram que houve uma significativa diminuição da atividade anticoagulante após estes processos. Conforme Whistler e Kosik (1971), a inserção de grupos carboxílicos na estrutura de polissacarídeos sulfatados de quitosana contribuiu para uma

maior atividade anticoagulante em todos os níveis de teor de sulfato. Segundo Santos-Fidencio *et al.* (2019), carragenanas parcialmente ou totalmente carboxiladas apresentaram um efeito sinérgico dos grupos carboxila na atividade anticoagulante, dependente da posição dos grupos sulfato na estrutura. Além disso, a oxidação intermediária levou a uma melhor ação anticoagulante do que a oxidação completa. Outro projeto realizado com oxidação de ulvana formou policarboxilados que apresentaram um aumento na atividade anticoagulante conforme o acréscimo do conteúdo ácido na sua estrutura (DE CARVALHO, 2018). Apesar de esses estudos demonstrarem que a presença do grupo carboxila aparenta ter uma ação sinérgica com o grupo sulfato para a ação anticoagulante, uma pesquisa realizada com pectina cítrica demonstrou que a fração que passou por maiores ciclos de carboxirredução, ou seja, diminuição dos grupamentos ácidos e posterior sulfatação, apresentou a melhor atividade anticoagulante (MAAS *et al.*, 2012). Desse modo, compreende-se que ainda é necessária a avaliação do efeito dos grupos carboxila nas diferentes estruturas polissacarídicas sobre a ação anticoagulante, a fim de fornecer maior entendimento da relação estrutura-atividade anticoagulante.

A goma guar é uma galactomanana processada a partir do endosperma da *Cyamopsis tetragonolobus* e consiste em uma cadeia linear central de unidades de β -(1 \rightarrow 4) D-manopirranose, parcialmente substituída em O-6 por terminais não redutores de α -(1 \rightarrow 6) D-galactopirranose, tendo uma razão de aproximadamente de 2 manoses para 1 galactose). Além disso, este polissacarídeo já é comercializado, o que contribui para a sua fácil aquisição, como também dispõe de uma estrutura bem conhecida (PRABAHARAN, 2011; THOMBARE *et al.*, 2016). Estudos previamente realizados com a goma guar comercial demonstraram que, quando parcialmente hidrolisada e sulfatada, ela apresenta uma atividade anticoagulante bastante promissora (BARDDAL *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2005). No entanto, não se conhece o efeito da carboxilação da goma guar e sua posterior sulfatação sobre a atividade anticoagulante. Pesquisas mostraram que é possível realizar a oxidação seletiva em C-6 mediada por TEMPO na goma guar, tendo sucesso no processo de inserção de grupos carboxílicos e conversão da unidade monossacarídica no seu respectivo derivado de ácido urônico (CRESCENZI *et al.*, 2004; SAKAKIBARA *et al.*, 2016). O composto N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) demonstrou, em 1995 (NOOY *et al.*, 1995), capacidade oxidante de hidroxilas primárias de polissacarídeos. Este agente apresenta algumas vantagens em relação aos outros métodos oxidantes presentes, como alta taxa de conversão, alta seletividade, reação rápida e baixo custo (PIERRE *et al.*, 2017). Além disso, a óxido-redução

do TEMPO permite que esse seja usado em poucas quantidades por ser regenerado continuamente *in situ* por um co-oxidante (DOS SANTOS, 2015). Um agente co-oxidante bastante interessante é o ácido tricloroisocianúrico (TCCA), pois esse apresenta quimiosseletividade, baixo custo, disponibilidade comercial e praticidade (ZOLFIGOL; SHIRINI; CHOGHAMARANI, 2006).

À procura de moléculas com atividade anticoagulante e potencial de serem administradas por via subcutânea visando terapias alternativas à heparina, escassez de elucidação acerca do papel dos ácidos urônicos em polissacarídeos sulfatados e conhecimento da estrutura e ação anticoagulante da goma guar parcialmente hidrolisada e quimicamente sulfatada, este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito da inserção de grupos carboxílicos na goma guar parcialmente hidrolisada, por meio da oxidação total e parcial de C-6 mediada por TEMPO/TCCA, além de grupos sulfato, sobre a atividade anticoagulante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HEMOSTASIA

O papel da hemostasia é garantir um equilíbrio entre o estado pró-coagulante e anticoagulante de modo a evitar extravasamento sanguíneo e manter o sangue intravascular em estado fluido (AUSTIN, 2017; CURNOW; PASALIC; FAVALORO, 2016). O endotélio, matriz subendotelial (ex. colágeno), plaquetas, fatores de coagulação, proteínas adesivas e proteínas inibitórias e fibrinolíticas compreendem o grupo de elementos importantes para manutenção da hemostasia.

O endotélio atua como uma barreira física, separando os elementos sanguíneos de estruturas subendoteliais, modula o tônus e permeabilidade vascular. As células endoteliais produzem inibidores da coagulação e da agregação plaquetária como trombosmodulina, heparan sulfato e dermatan sulfato, e prostaciclina e óxido nítrico, respectivamente. Além disso, o endotélio produz ativadores e inibidores da fibrinólise, responsável pela degradação do coágulo (AUSTIN, 2017).

Quando o vaso sanguíneo sofre alguma lesão, expõe a matriz extracelular subjacente e fatores pró-trombóticos como endotelina, colágeno, Fator de Von Willebrand (FVW), fibronectina (promove a adesão plaquetária) e fator tecidual (FT). A endotelina promove contração da microvasculatura na região da injúria (CURNOW; PASALIC; FAVALORO, 2016). As plaquetas são fragmentos celulares circulantes, anucleares, produzidas pelos megacariócitos, e têm a função de transportar vesículas contendo proteínas pró-trombóticas, fatores de crescimento e outras moléculas. Como as plaquetas circulam perto do endotélio, conseguem facilmente reconhecer injúria ou lesão. A hemostasia primária consiste na adesão, ativação e agregação plaquetária, compreendendo uma interação dinâmica contínua entre o endotélio, as proteínas plasmáticas e as plaquetas (AUSTIN, 2017).

A adesão plaquetária na região injuriada se dá pela circulação das plaquetas ao longo da superfície endotelial e sua adesão ao FVW por meio da sua glicoproteína de superfície plaquetária Iba (GPIba). O FVW é uma grande proteína adesiva sintetizada pelo endotélio e secretado no plasma e matriz subendotelial. Essa proteína se liga ao colágeno exposto pela lesão e atua como uma ponte entre as plaquetas e o tecido conjuntivo subendotelial. Porém, a adesão inicial não é tão estável e isso permite que as plaquetas continuem rolando lentamente. Com isso, as plaquetas são ativadas e uma segunda glicoproteína de superfície sofre

alterações, a glicoproteína de superfície plaquetária IIb-IIIa (GPIIb-IIIa), permitindo a ligação entre esse receptor e o fibrinogênio, resultando em uma adesão mais firme. GPIIb-IIIa pode se ligar com o FVW e outras proteínas adesivas também (fibronectina, vitronectina). Além disso, a adesão é auxiliada pela presença do colágeno (AUSTIN, 2017).

A ativação das plaquetas resulta em uma mudança estrutural. Elas se tornam esféricas com pseudópodes protuberantes. Conforme as plaquetas são ativadas, plaquetas adicionais chegam e se aderem às plaquetas ativadas aderentes. Esse processo é mediado por fibrinogênio ligado a GPIIb-IIIa nas plaquetas ativadas, que atua como uma estrutura semelhante a uma ponte que pega as plaquetas que passam. Um microtrombo de agregado plaquetário é formado rapidamente (AUSTIN, 2017). Esse processo é chamado de hemostasia primária (CURNOW; PASALIC; FAVALORO, 2016).

A hemostasia secundária é referenciada geralmente como modelo de cascata de coagulação proposto por Davie&Ratnoff e Macfarlane em 1964. Esse modelo descreveu o envolvimento de proteínas de coagulação (zimogênios), aos quais, na presença de fosfolípidos e cálcio, são ativados sequencialmente em serino-proteases até a formação de um coágulo firme e estável. Atualmente, a hemostasia secundária é compreendida como um processo que está baseado principalmente pela presença de uma proteína: Fator Tecidual/Tissular (FT). Neste modelo, o processo de coagulação é representado por três fases sobrepostas ao invés de sequenciais (CURNOW; PASALIC; FAVALORO, 2016).

O sistema fibrinolítico é o processo final responsável pela degradação do coágulo, restituindo a característica fluida do sangue. Este processo degrada a fibrina estável por meio da atuação da plasmina, proveniente da proteólise do plasminogênio. Em relação ao equilíbrio hemostático, o processo de fibrinólise é tão importante quanto o processo coagulante (CARLOS; FREITAS, 2007).

2.2 COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

O processo de coagulação, também conhecido como hemostasia secundária, ocorre devido a uma ativação sequencial dos fatores de coagulação. A maioria dos fatores de coagulação são precursores de enzimas proteolíticas conhecidas como zimogênios, os quais

circulam de forma inativa. Zimogênios e cofatores na presença de fosfolipídeos, oriundos da membrana plaquetária e do endotélio danificado, sofrem ativação tornando-se serino-proteases. A ativação do zimogênio ocorre quando este é clivado. Nesta condição ele recebe o sufixo "a" ao algarismo romano específico, por exemplo, FXa (Fator X ativado). O modelo clássico de cascata de coagulação (Figura 1) foi baseado no conceito de vias de coagulação intrínseca e extrínseca, as quais convergem para uma via final comum (AUSTIN, 2017; CURNOW; PASALIC; FAVALORO, 2016; PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

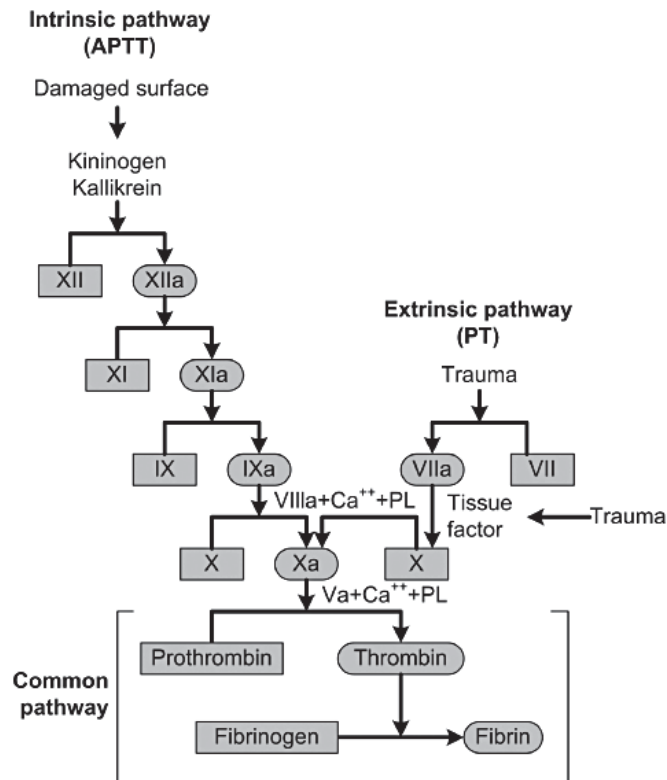
A via intrínseca é iniciada por contato, quando plaquetas interagem com componentes intravasculares carregados negativamente, como colágeno, exposto na superfície que foi lesionada (ADAMS; BIRD, 2009). Essa ativação requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (uma serino-protease) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). A via se inicia com a formação do Fator XIIa, que cliva a pré-caliceína gerando a caliceína. Por sua vez, a caliceína contribui ainda mais para a ativação do Fator XII. O Fator XIIa na presença do cininogênio de alto peso molecular ativa o Fator XI, que, por sua vez, ativa o Fator IX. O Fator IXa, na presença do Fator VIIIa e cálcio, ativa o Fator X da coagulação (FRANCO, 2001; RUTTMANN, 2006). O Fator VIII circula no plasma principalmente como um complexo não covalente com o FVW. Por sua vez, o FVW, ao se ligar às plaquetas aderidas na região da lesão, favorece a sua dissociação e ativação do Fator VIII. Além disso, a trombina também pode retroalimentar a ativação do Fator VIII (NORRIS, 2003).

A via extrínseca ocorre por meio do contato com proteínas não sanguíneas devido a lesão vascular. A tromboplastina tecidual, conhecida como Fator III ou mais comumente como Fator Tissular (FT), é uma proteína intrínseca da membrana plasmática de muitos tipos celulares. Normalmente o FT não está presente na corrente sanguínea, porém, quando há um dano, há um aumento da sua concentração no ambiente vascular, ativando a via extrínseca da cascata de coagulação (RUTTMANN, 2006). O FT se combina com o Fator VII e esse complexo na presença de cálcio consegue ativar o Fator X como também o Fator IX (RUTTMANN, 2006).

Ambas as vias (intrínseca e extrínseca) resultam na ativação do Fator X e início da via comum. O Fator X ativado combina-se com o Fator Va e cálcio para ativação do Fator II (protrombina) em Fator IIa (trombina). A trombina atua convertendo o Fator I (fibrinogênio) em monômeros de fibrina, que são posteriormente interligados pela ação do Fator XIIIa e

cálcio, resultando em monômeros de fibrina estáveis e insolúveis. O Fator XIII circula no plasma normalmente na forma inativa e é ativado na presença da trombina (CARLOS; FREITAS, 2007; ROMÁN OCHOA, 2017).

FIGURA 1 – MODELO CLÁSSICO DA CASCATA DE COAGULAÇÃO.



FONTE: Adams e Bird (2009).

O modelo clássico da cascata de coagulação contribuiu para o desenvolvimento de testes laboratoriais de triagem para identificar deficiências nas vias de coagulação extrínseca, intrínseca e comum pelos testes de tempo de protrombina (PT), tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e tempo de trombina (TT), respectivamente. (AUSTIN, 2017). Estes testes de triagem de coagulação acusam anormalidade caso o paciente tenha uma deficiência ou disfunção em algum fator de coagulação. Porém, os resultados obtidos não fornecem isoladamente informações sobre o risco de sangramento. Portanto, a história clínica é essencial, juntamente com os resultados obtidos nos parâmetros laboratoriais, para buscar a melhor estratégia clínica ao paciente (ADAMS; BIRD, 2009).

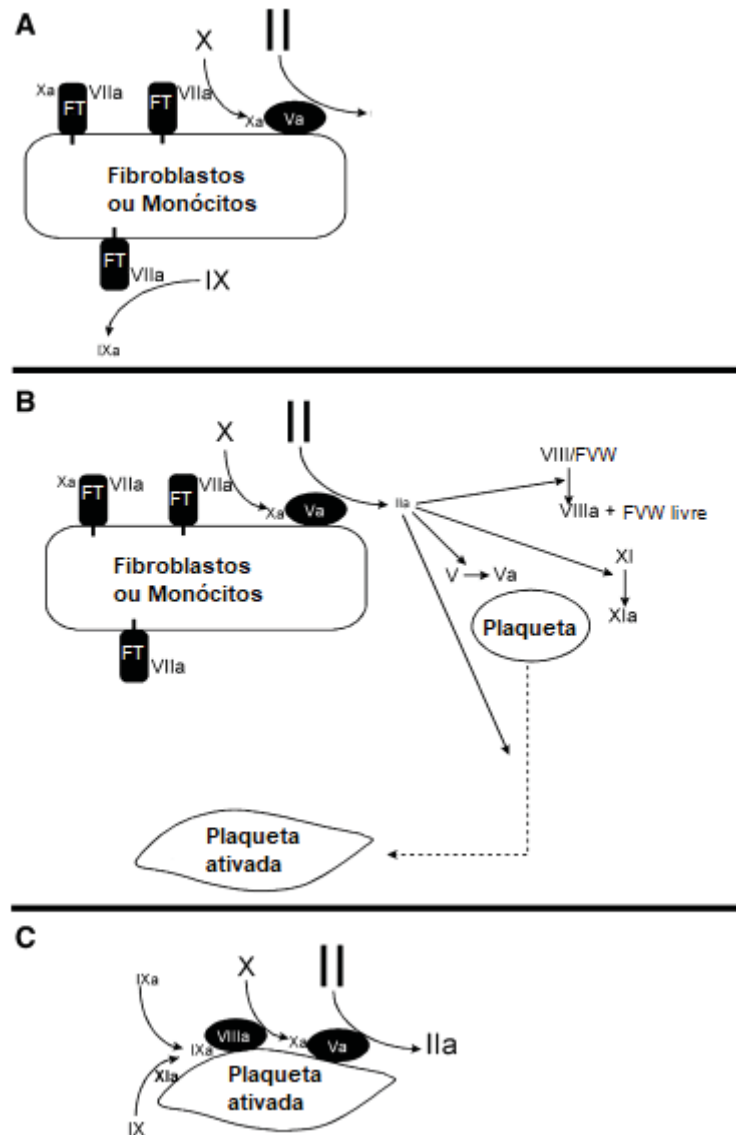
O PT está relacionado ao tempo necessário para formação de um coágulo após adição do fator tecidual e cálcio no plasma citratado. Este teste contribui na identificação de anormalidades nos fatores de coagulação envolvidos na via extrínseca como os Fatores X, VII, V e protrombina. Como três fatores dessa via são dependentes da vitamina K (II, VII e X), esse teste é o de escolha para monitoramento de pacientes sob administração dos anticoagulantes antagonistas da vitamina K (CARLOS; FREITAS, 2007; CLÉ *et al.*, 2010).

O aPTT correlaciona-se com o tempo para formação de um coágulo após a adição do ativador de fase de contato, por exemplo, sílica e cefalina, que tem a função de substituir os fosfolípidios da membrana plaquetária. Esse teste é o indicado para avaliação de anormalidades nos fatores de coagulação envolvidos na via intrínseca (XII, XI, IX, VIII, X, II e I) e é o teste de escolha para monitoramento de pacientes sob administração de heparina (CARLOS; FREITAS, 2007; CLÉ *et al.*, 2010).

O TT é adquirido após adição de trombina. Dessa maneira, o tempo para formação do coágulo é influenciado pela concentração de fibrinogênio e inibidores da fibrina (CLÉ *et al.*, 2010).

Apesar da contribuição do modelo clássico da cascata de coagulação para o entendimento da fisiologia da coagulação, esta representa atualmente um papel apenas didático. Sabe-se que há uma interação mais complexa entre os fatores de coagulação, demonstrando que as vias intrínseca e extrínseca não atuam isoladamente, dando origem a um novo modelo baseado em células (CLÉ *et al.*, 2010). Esse modelo pode ser dividido em três fases, como demonstrado na Figura 2: iniciação, em que é formada uma pequena quantidade de fatores de coagulação ativos; amplificação, em que o nível de fatores de coagulação ativos é aumentado; e propagação, em que os fatores de coagulação se ligam nas membranas pró-coagulantes de plaquetas ativadas e coágulos de fibrina são formados (VERSTEEG *et al.*, 2013).

FIGURA 2 – FASES DO MODELO DE COAGULAÇÃO BASEADO EM CÉLULAS.



LEGENDA: A) Iniciação: A fase de iniciação ocorre na célula portadora de FT em que o FXa se combina com FVa para gerar uma pequena quantidade de trombina; B) Amplificação: A pequena quantidade de trombina gerada na célula portadora de FT amplifica a resposta pró-coagulante por meio da ativação de cofatores, FXI e plaquetas; C) Propagação: Nessa etapa é gerado uma grande quantidade de trombina na superfície das plaquetas. FONTE: Adaptado de Hoffman e Monroe (2007).

O processo de coagulação se inicia devido a exposição de FT na corrente sanguínea. O FT é uma glicoproteína transmembranar que não é expressa constitutivamente nas células de contato direto com o sangue, como as células endoteliais e leucócitos. Porém, está presente em células do músculo liso e fibroblastos, que são subjacentes ao endotélio vascular. Além disso, o FT também é expresso em queratinócitos, células epiteliais do trato respiratório e gastrointestinal, cérebro, células musculares cardíacas e glomérulos renais. As células

endoteliais e monócitos podem expressar FT quando estão sendo estimuladas devido a lesão endotelial e na presença de endotoxinas e citocinas como TNF- α e IL-1 (FRANCO, 2001).

Uma pequena quantidade do FVIIa (aproximadamente 1% da concentração plasmática do fator VII) é encontrado circulante na corrente sanguínea e consegue se ligar ao FT das células portadoras de FT, formando o complexo FT/FVIIa, denominado de complexo protrombinase extrínseco. Esse complexo consegue ativar o FVII e possui como substratos principais o FIX e FX, resultando na ativação de ambos os fatores e formação de trombina e fibrina. Embora nessa fase tenha a formação de pequena quantidade de trombina, essa já é capaz de ativar o FV e FVIII, os quais são fundamentais para geração do complexo tenase intrínseco (FIXa/VIIIa) e complexo protrombinase (Va/Xa) (FRANCO, 2001). Com isso, o complexo FVIII/FVW é dissociado e o FVW consegue mediar a adesão e agregação plaquetária na região da lesão (CLÉ *et al.*, 2010). A formação do complexo FIXa/VIIIa na superfície das plaquetas é essencial no processo de amplificação da coagulação pois aumenta a ativação do FX em FXa que juntamente com o FVa gera uma grande quantidade de trombina e, conseqüentemente, de fibrina requerida para a formação do trombo estável (ADAMS; BIRD, 2009). A trombina que foi produzida contribui para um ciclo de *feedback* positivo ao promover ativação plaquetária, formação de FIXa/VIIIa, resultando ao final, em mais trombina (CLÉ *et al.*, 2010).

2.3 REGULAÇÃO DA COAGULAÇÃO

A regulação da coagulação sanguínea é essencial para manutenção da hemostasia, tendo por objetivo evitar uma ativação generalizada dos fatores de coagulação e formação excessiva de coágulos. O processo de coagulação deve estar ativado apenas no local onde ocorreu a lesão e durante tempo suficiente para obstruir a ferida (NORRIS, 2003). Por este motivo, a atividade das proteases de coagulação é regulada por proteínas inibitórias, sendo denominadas de anticoagulantes naturais. Os principais anticoagulantes naturais presentes no organismo humano incluem a antitrombina (AT), cofator II da heparina (HCII), inibidor da via do fator tecidual (IFT), proteína C (PC) e a proteína S (PS) (FRANCO, 2001; NORRIS, 2003).

A AT é um inibidor de serinoproteases e consegue se ligar e inativar, principalmente, a trombina e FXa, além dos fatores de coagulação IXa, XIa e XIIa (PALTA; SAROA; PALTA, 2014; CURNOW; PASALIC; FAVALORO, 2016). As moléculas de heparan sulfato, presente na membrana celular endotelial, e administração de heparina potencializam a atividade inibitória da AT (PALTA; SAROA; PALTA, 2014; ADAMS; BIRD, 2009). O cofator II da heparina (HCII) é uma proteína que inibe principalmente a trombina na presença de diferentes tipos de moléculas polianiónicas incluindo os glicosaminoglicanos como heparina e sulfato de dermatan (RAU *et al.*, 2007).

O complexo FT/VIIa é um potente ativador dos Fatores IX e X, portanto, deve ser inativado rapidamente. O IFT é uma proteína que apresenta múltiplos domínios e é produzida constitutivamente pelas células endoteliais. Essa proteína apresenta a capacidade de se ligar por meio de um domínio ao FXa e inibi-lo rapidamente. A partir disso, consegue se ligar com outro domínio ao complexo protrombinase extrínseco, formando um complexo quaternário inibitório (FRANCO, 2001; NORRIS, 2003).

A PC é um zimogênio proteico localizado no endotélio ligado ao seu receptor expresso no endotélio celular (EPCR). Essa proteína é ativada quando a trombina se liga ao receptor endotelial trombomodulina (TM), dissociando a PC do EPCR. A proteína C ativada (PCa) forma um complexo com a PS, a qual atua como cofator não enzimático (VERSTEEG *et al.*, 2013). O complexo PCa/PS consegue clivar e inativar principalmente os fatores Va e VIIIa. Esse sistema demonstra que a trombina, embora tenha ação pró-coagulante, quando é produzida em excesso, apresenta uma ação anticoagulante por meio da sua ligação ao TM, que inicia o processo inibitório representado pela ativação da PC (FRANCO, 2001).

2.4 DISTURBIOS HEMOSTÁTICOS

A fisiologia normal do organismo humano presa pelo equilíbrio entre coagulação e sangramento. Portanto, complicações hemorrágicas ou trombóticas demonstram alteração neste equilíbrio e são categorizadas como um quadro patológico (PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

Os distúrbios constitutivos ou adquiridos associado a estados hipercoaguláveis são denominados de trombofilias, as quais resultam em quadros de trombose (PALTA; SAROA; PALTA, 2014). A trombose se dá pela presença de um coágulo dentro de um vaso sanguíneo, o qual reduz o fluxo sanguíneo e possibilita a ocorrência de infarto dos tecidos irrigados por aquele vaso. A trombose que ocorre nas artérias, denominada de trombose arterial, comumente leva ao infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral e quando ocorre nas veias, denominada de tromboembolismo venoso, geralmente acomete as pernas ocasionando a trombose venosa profunda que também está associada à embolia pulmonar. Existem muitos fatores de risco tanto genéticos quanto adquiridos que estão associados a um estado hipercoagulável, como deficiências nos anticoagulantes naturais (antitrombina, proteína C e proteína S), polimorfismos genéticos relacionados aos fatores de coagulação (FV, protrombina e fibrinogênio), idade, cirurgias, obesidade, câncer, gravidez, anticoncepcionais hormonais, imobilização, entre outros (MACKMAN, 2012).

A principal origem da trombose arterial se dá pela ruptura da placa aterosclerótica desenvolvida na parede arterial por meio do acúmulo de lipídios e macrófagos carregados de lipídios na camada íntima das artérias. Quando há uma ruptura da placa aterosclerótica, as plaquetas são rapidamente recrutadas para a região através da interação de seus receptores com o colágeno e o FVW. A agregação plaquetária inicial torna as plaquetas ativadas e estimula o recrutamento, adesão, agregação e ativação de mais plaquetas para a região. Além disso, o FT apresenta-se em grande concentração nas placas ateroscleróticas contribuindo para o processo de coagulação (MACKMAN, 2008).

Dentre as doenças cardiovasculares, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, e tromboembolismo venoso são as principais causadoras de óbitos. A trombose venosa profunda ocorre mais frequentemente nas veias das pernas e a embolia pulmonar é uma complicação que pode ocorrer se parte do trombo se desprende e caminha até os pulmões, se alojando em uma artéria pulmonar, resultando no impedimento de irrigação do tecido. A trombose venosa profunda ocorre geralmente devido a mudança na composição do sangue, o que pode ocorrer caso haja alguma estase sanguínea ou alterações na parede do vaso (MACKMAN, 2008). O tromboembolismo venoso apresenta uma incidência nos países industrializados de 1 a 3 indivíduos por 1.000 por ano, sendo que acima dos 50 anos de idade essa incidência chega a 1 indivíduo a cada 100 por ano (MACKMAN, 2012).

As hemofilias são exemplos de distúrbios relacionados ao sangramento excessivo. A Hemofilia A é a mais comum e está associada a uma mutação no gene do FVIII e a Hemofilia B, segunda mais comum, está relacionada a mutação no gene do FIX (PALTA; SAROA; PALTA, 2014). As Hemofilias estão associadas ao cromossomo X e são prevalentes no sexo masculino, apresentando-se com diferentes gravidades (severa, moderada ou leve) conforme o nível plasmático do fator de coagulação correspondente (FRANCHINI; MANNUCCI, 2012).

Existem muitos distúrbios hemostáticos que apresentam um quadro hemorrágico, os quais podem apresentar uma origem hereditária ou adquirida. Doença de Von Willebrand, afibrinogenemia, coagulação intravascular disseminada repentinamente, deficiência de vitamina K, hepatopatologias, entre outros, são exemplos de desordens que podem ocasionar sangramentos excessivos (PALTA; SAROA; PALTA, 2014).

2.5 MEDICAMENTOS ANTICOAGULANTES

Os medicamentos anticoagulantes apresentam como papel reduzir a atividade das proteínas da cascata de coagulação por meio de inibição direta, inibição por modificação pós-traducional ou por aumento da atividade anticoagulante (MACKMAN, 2008). Os principais medicamentos anticoagulantes disponíveis atualmente atuam sobre múltiplos fatores de coagulação, como exemplo da varfarina e da heparina (ADAMS; BIRD, 2009).

A varfarina é o antagonista da vitamina K mais comumente prescrito. Esses inibidores são utilizados há longa data e são administrados por via oral. O mecanismo de ação se dá pela inibição da enzima vitamina K redutase e epóxido redutase, que utilizam a vitamina K para modificação pós-traducional de inúmeras proteínas da coagulação, como os fatores VII, IX, X e II. Apesar da grande utilização, há uma incidência entre 1-3% de sangramentos nos pacientes tratados com varfarina. Além disso, a sua ação pode ser afetada conforme dieta e questões genéticas (ADAMS; BIRD, 2009; MACKAMN, 2008).

A heparina é outra molécula que confere ação anticoagulante. Esta foi descrita pela primeira vez em 1916 e tem o seu mecanismo de ação claramente esclarecido. A heparina não fracionada, ou seja, de alta massa molecular, é comumente utilizada para cirurgias cardiovasculares e para prevenção de tromboembolismo venoso. A heparina de baixa

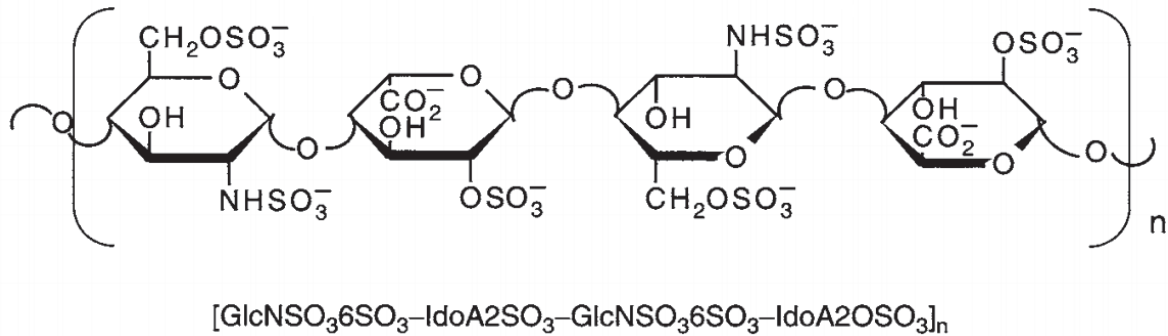
molecular foi desenvolvida posteriormente e a sua utilização conferiu uma menor incidência de sangramentos. Ambas apresentam ação anticoagulante por se ligarem a proteína, principalmente, à AT, potencializando a ação inibitória desta serpina sobre o FXa e a trombina (ADAMS; BIRD, 2009; MACKAMN, 2008).

Atualmente novos fármacos têm sido projetados visando um único fator de coagulação, tornando-se mais específicos (MACKMAN, 2008). Fondaparinux é um análogo sintético da sequência pentassacarídica da heparina que interage com a AT. Esse fármaco inibe o FXa sem resultados efetivos na inibição da trombina. A sua utilização confere uma resposta farmacocinética linear, com dose resposta previsível, porém, não deve ser administrado em pacientes com comprometimento renal. Alguns fármacos que atuam como inibidores seletivos da trombina são desirudina, lepirudina, bivalirudina e argatrobana. Ambos os medicamentos conseguem inibir a trombina de maneira irreversível. Alguns outros polímeros foram configurados para administração oral, como ximelagatrana e dabigatrana, que inibem diretamente a trombina, e rivaroxabana, razaxabana e apixabana, que inibem a atividade do FXa (ADAMS; BIRD, 2009). Porém, atualmente não existem agentes reversores específicos para os anticoagulantes orais inibidores do FXa (THOMAS; MAKRIS, 2018).

2.6 HEPARINA

A heparina se encontra ligada a uma proteína, formando um proteoglicano e é confinada em grânulos de mastócitos (MULLOY *et al.*, 2016). A heparina é um polissacarídeo sulfatado pertencente à família dos glicosaminoglicanos (GAGs), sendo constituído por sequências dissacarídicas de um ácido urônico e um aminoaçúcar. Os resíduos de ácido urônico correspondem ao α -L-idurônico (IdoA) e β -D-glucurônico (GlcA), e os resíduos de aminoaçúcar são de α -D-glucosamina (GlcN). As unidades monossacarídicas são unidas entre si por ligações glicosídicas 1→4 (FIGURA 3).

FIGURA 3 – ESTRUTURA DA HEPARINA.



FONTE: Casu (2005).

No terminal das cadeias dos GAGs constituintes de peptidoglicanos, encontram-se sequências curtas contendo D-galactose (Gal) e D-xylose (Xyl). As unidades de GlcN são geralmente N e/ou O-sulfatadas e os ácidos urônicos, principalmente IdoA, apresentam-se O-sulfatados. A estrutura da heparina apresenta padrões que são distribuídos de forma desigual ao longo da sua cadeia polimérica. A sequência dissacarídica mais frequente na heparina é trissulfatada composta por IdoA2SO₃-GlcNSO₃6SO₃. Estes segmentos altamente sulfatados (N-, 2-O-, e 6-O- sulfatado) são denominados de regiões regulares e são os maiores contribuintes para as propriedades polieletrônicas da heparina. Essas unidades representam 60-75% da heparina obtida a partir da mucosa de suínos e até 85% da obtida do pulmão de bovinos (CASU, 2005). Heparan sulfato é formado pela mesma repetição dissacarídica, porém com proporções diferentes, apresentando um teor de sulfato menor do que a heparina (MULLOY *et al.*, 2016). Isso resulta, em comparação com o heparan sulfato, uma maior afinidade de ligação da heparina com as proteínas ligantes (ASLANI *et al.*, 2020).

A heparina é um dos anticoagulantes mais utilizados na clínica e, também contribui ao apresentar uma diversidade de atividades biológicas, como atividade anti-inflamatória, inibição da ativação do sistema complemento, antitumoral, antiviral e regulador da atividade antiangiogênica, se tornando um agente polifarmacêutico. A heparina é uma das moléculas com maior densidade de cargas devido a presença dos seus resíduos carboxila e sulfato, o que permite uma interação eletrostática de alta seletividade com uma variedade de proteínas. A heparina apresenta em sua estrutura, uma região pentassacarídica capaz de se ligar a AT com especificidade, inibindo FXa e FIIa, que são componentes essenciais na cascata de coagulação. Para essas reações, a heparina atua como um catalizador, causando alterações conformacionais na AT, promovendo o aumento da atividade inibitória desta serpina

(ASLANI *et al.*, 2020). A AT requer a presença de um pentassacarídeo exclusivo com pelo menos 18 resíduos de açúcares para sua ligação. Embora em menor grau, a heparina também pode inibir a trombina por meio do cofator II da heparina (CASU, 2005).

A heparina foi isolada de células hepáticas caninas em 1916 pelos pesquisadores Jay McLean e William Howell. Durante os anos de 1930 a 1950, vários cientistas testaram a fabricação de heparina de diferentes tecidos animais como fígado e pulmão de cães e bois. Atualmente, a mucosa do tecido intestinal suíno se tornou a principal fonte de heparina. Embora a heparina tenha uma ação anticoagulante potente, a qual consegue ser facilmente neutralizada pela protamina (pool de proteínas de baixo peso molecular, com uma elevada proporção de arginina), que atua como um antídoto, a sua utilização pode apresentar algumas desvantagens. Devido aos padrões desiguais presentes na estrutura da heparina, é possível notar uma variação do seu efeito entre os pacientes, o que torna a heparina pouco previsível e com necessidade de monitoramento de rotina (CHANDARAJOTI; LIU; PAWLINSKI, 2016; ODUAH *et al.*, 2016). Além disso, a administração de heparina está associada ao desenvolvimento de trombocitopenia induzida em até 2 a 3% dos pacientes. Devido a essas questões, a heparina é prescrita geralmente em pacientes hospitalizados submetidos a circulação extracorpórea ou hemodiálise, já que não apresenta riscos para a função renal (CHANDARAJOTI; LIU; PAWLINSKI, 2016).

Em 1970-1980, surgiu a heparina fracionada (LMWH), ou seja, com um menor tamanho molecular, tendo por objetivo conferir mais segurança na sua administração (ODUAH *et al.*, 2016). A heparina possui tamanho molecular que varia de 3.000- 30.000 g/mol, tendo uma média de 14.000 g/mol e a heparina fracionada (LMWH) entre 3.500-6.000 g/mol. A LMWH apresentou alguns benefícios, como maior biodisponibilidade previsível através da administração subcutânea, menor risco de indução de trombocitopenia e uma meia-vida superior do que a heparina não fracionada (CHANDARAJOTI; LIU; PAWLINSKI, 2016). A incidência de trombocitopenia induzida é aproximadamente dez vezes menor nos pacientes administrados com LMWH do que com heparina não fracionada (IVASCU *et al.*, 2019). Esses benefícios apresentados pela LMWH contribuíram para a sua administração em casos de tratamento ambulatorial e profilaxia de tromboembolismo venoso, como para pacientes infartados e com angina instável. Porém, a LMWH pode agravar os casos de pacientes que apresentam a função renal comprometida (CHANDARAJOTI; LIU; PAWLINSKI, 2016) e a protamina não apresenta a mesma potência neutralizadora como antídoto (ODUAH *et al.*, 2016).

Além de algumas desvantagens já mencionadas, problemas associados a heparina já surgiram e causam preocupação quanto a sua utilização. Em 2007-2008 houve uma adulteração da heparina com sulfato de condroitina supersulfatada, com o objetivo de ganho econômico. Porém, essa contaminação ocasionou reações alérgicas e mortes em mais de cem pacientes que estavam utilizando o fármaco. Além disso, passou-se a ter uma maior preocupação com o processo de obtenção de heparina de tecido animal, devido a surtos de doenças, como por exemplo a gripe suína, podendo impactar significativamente na fabricação e disponibilidade do medicamento (CHANDARAJOTI; LIU; PAWLINSKI, 2016). Ainda mais, devido a possibilidade de contrair Creutzfeldt-Jakob a partir do uso de heparina bovina, a União Européia e os Estados Unidos recebem heparina apenas de origem suína (MULLOY *et al.*, 2016). Devido a esses pontos, muitos estudos têm sido realizados buscando alternativas à heparina (CHANDARAJOTI; LIU; PAWLINSKI, 2016).

2.7 SULFATAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

A partir do interesse em alternativas a heparina, as pesquisas inicialmente focaram em polissacarídeos de origem animal com estrutura semelhante a heparina, como sulfato de condroitina e dermatan sulfato fucosilado. O campo de pesquisa foi posteriormente ampliado, o que permitiu a análise de polissacarídeos sulfatados de diferentes origens, como animais marinhos invertebrados e algas. A importância dos grupos com carga negativa, principalmente dos grupos sulfato, para promoção da atividade anticoagulante foi sendo esclarecido, o que contribuiu para o surgimento dos estudos utilizando polissacarídeos quimicamente sulfatados (MESTECHKINA; SCHERBUKHIN, 2010).

A presença de grupos sulfato em polissacarídeos pode conferir uma variedade de atividades biológicas interessantes, como anticoagulante, antioxidante, antitumoral e antiviral (LU *et al.*, 2012). A atividade anticoagulante proporcionada pelos polissacarídeos sulfatados depende de regiões de ligação não específicas que podem, portanto, ser constituídas por monossacarídeos variados com diferentes sequências de unidades. A cadeia do polissacarídeo (composição monossacarídica, peso molecular e conformação da cadeia) e o seu grupamento aniônico (grupos sulfato e carboxilato) são fatores estruturais combinatórios importantes para promoção da ação anticoagulante (CIANCIA; QUINTANA; CERESO, 2010; WANG *et al.*, 2015). Estudos com polissacarídeos naturalmente sulfatados oriundos de organismos marinhos

e com polissacarídeos quimicamente sulfatados sintetizados a partir de polissacarídeos oriundos de plantas, frutas, sementes e fungos, confirmam a possibilidade de ação anticoagulante a partir de estruturas distintas (ADRIEN *et al.*, 2019; CHAGAS *et al.*, 2020; LIANG *et al.*, 2018; BARDDAL *et al.*, 2020).

A sulfatação é realizada em solventes orgânicos como formamida, dimetilformamida e dimetilsulfóxido (MESTECHKINA; SCHERBUKHIN, 2010). Os agentes sulfatantes geralmente utilizados para sulfatação química de polissacarídeos são o ácido clorossulfônico e o complexo de trióxido de enxofre-piridina (SO₃-piridina) (ROMÁN OCHOA *et al.*, 2017). O método utilizando ácido clorossulfônico ainda é a abordagem mais comum para sulfatação de polissacarídeos, porém, em altas temperaturas o polímero pode se degradar e a metodologia usando esse reagente não apresenta um fácil manuseio. O método utilizando SO₃-piridina é uma alternativa interessante neste caso, pois apresenta eficiência no processo de sulfatação e é de fácil manuseio, porém, mais dispendiosa financeiramente (WANG *et al.*, 2018; CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019). O processo de sulfatação depende de muitos parâmetros como o agente sulfatante, solvente, tempo de reação, temperatura e razão molar entre os reagentes. A metodologia utilizada no processo consegue influenciar ao final no grau de substituição por monômero, denominado de DS. Conforme a literatura, a faixa de temperatura utilizada durante o processo é bastante ampla podendo variar de 8-80°C. A quantidade do agente sulfatante pode variar conforme cada estudo e material a ser estudado. Porém, sempre é utilizado em excesso em relação à quantidade de hidroxilas livres do polissacarídeo (MESTECHKINA; SCHERBUKHIN, 2010).

2.8 OXIDAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Existem muitos elementos que podem influenciar na atividade anticoagulante promovida por polissacarídeos sulfatados. Sabe-se que a presença dos resíduos de sulfato é essencial para conferir a ação anticoagulante, porém, não é o único requisito. Um grande exemplo é o sulfato de dermatan, que apesar do alto teor de sulfato, não apresenta resultados promissores. O outro grupo aniônico presente na heparina é o grupo carboxila (CIANCIA; QUINTANA; CEREZO, 2010). A região regular da heparina é constituída por sequências dissacarídicas, nas quais um dos monossacarídeos é um ácido urônico (CASU, 2005).

Portanto, a oxidação seletiva do C-6 de polissacarídeos pode auxiliar na avaliação da contribuição dos ácidos urônicos na promoção da atividade anticoagulante. Ainda não há uma constatação de que os grupos carboxila tenham importância para a atividade anticoagulante, mas alguns estudos avaliaram a relação sinérgica que podem ter com os grupos sulfato (CIANCIA; QUINTANA; CERESO, 2010).

A análise da ação anticoagulante da heparina sem a presença dos grupamentos carboxílicos por meio de esterificação (AGARWAL; DANISHEFSKY, 1986) e ciclos de carboxirredução (WESSEL, 1990) demonstraram que houve uma significativa diminuição da atividade anticoagulante após estes processos. Conforme Whistler e Kosik (1971), embora a estrutura da quitosana sulfatada apresente alto teor de sulfato, esta exibia pouca atividade anticoagulante. Devido a isso, foi avaliado se a inserção de grupos carboxílicos na estrutura do polissacarídeo poderia ser benéfica. Os pesquisadores obtiveram resultados promissores em todos os níveis de teor de sulfato após o processo de oxidação. Em outro estudo, carragenanas parcialmente ou totalmente carboxiladas apresentaram um aumento na atividade anticoagulante após acréscimo do teor de ácido urônico. Os autores relataram que o efeito sinérgico dos grupos carboxila na atividade anticoagulante foi dependente da posição dos grupos sulfato na estrutura, sendo superior nos pontos de inserção de sulfato em C-2, em relação ao C-4. Além disso, a oxidação intermediária do polissacarídeo apresentou uma melhor ação anticoagulante do que os de oxidação completa (SANTOS-FIDENCIO *et al.*, 2019). Do outro lado, Maas *et al.* (2012), estudando pectina cítrica, demonstraram que a fração que passou por maiores ciclos de carboxirredução, seguida de sulfatação química, apresentou a melhor atividade anticoagulante. Diante disso, nota-se que ainda pouco se sabe sobre a contribuição da oxidação seletiva no C-6 para os polissacarídeos sulfatados em relação à promoção da atividade anticoagulante.

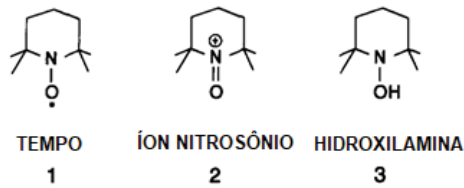
O interesse industrial e da comunidade científica por polissacarídeos ácidos se deve às propriedades que estes podem apresentar, como antifloculação, adesão, gelificação, espessamento, complexação, além de algumas atividades biológicas (PIERRE *et al.*, 2017). Existem vários métodos de oxidação de polissacarídeos que envolvem a participação de metais de transição, como cromo, rutênio e tungstênio, como também óxidos de nitrogênio, ozônio, peróxido de hidrogênio, periodato de sódio e diferentes compostos halogenados (NaOCl, NaClO₂, NaClO₃, NaBrO₃, ClO₂). Esses métodos oxidam tanto hidroxilas primárias quanto as secundárias do polímero e podem provocar a clivagem de ligações glicosídicas (DOS SANTOS, 2015). O método de oxidação utilizando o reagente N-oxil-2,2,6,6-

tetrametilpiridina (TEMPO) foi originado em 1983 pelo trabalho de Semmelhack e colaboradores e se mostrou muito interessante para conversão de monossacarídeos neutros em seus ácidos urônicos correspondentes, devido ao caráter quimiosseletivo para hidroxilas primárias, mesmo na presença de hidroxilas secundárias (NOOY; BESEMER; BEKKUM, 1995). Estudos avaliaram que reações de oxidação utilizando TEMPO em um pH inferior a 8 resultou em uma taxa semelhante de oxidação dentre as hidroxilas primárias e secundárias. A partir do aumento do pH, a reação revelou ser específica para hidroxilas primárias. Além disso, em relação aos solventes a serem utilizados, a água demonstrou ser ideal para uma maior taxa de conversão das hidroxilas até ácidos carboxílicos, diferentemente dos solventes orgânicos que em média convertiam preferencialmente até aldeídos (PONEDEL'KINA; KHAIBRAKHMANOVA; ODINOKOV, 2010).

Em 1995, Nooy; Besemer e Bekkum descreveram uma metodologia utilizando o reagente TEMPO em meio básico, gerando polissacarídeos com oxidação superior à 95%, sem apresentar produtos secundários. Desde então, foram realizados vários estudos utilizando o TEMPO para oxidação de polissacarídeos como em galactomananas, hialuronanos, maltodextranas, etc. Esses estudos comprovaram que a reação é leve e seletiva ao oxidar apenas as hidroxilas primárias correspondentes ao C-6 sem afetar as hidroxilas secundárias dos demais carbonos do polímero. Portanto, o reagente TEMPO demonstrou ser um composto bastante promissor para oxidação seletiva do C-6 de polissacarídeos (DING *et al.*, 2008).

O interesse no reagente TEMPO ao invés de oxidantes envolvendo metais de transição se justifica, principalmente, devido à disponibilidade e baixo custo para reação, realização da reação em sistema aquoso, interação com oxidantes comuns possibilitando regeneração e resistência à auto-oxidação (PIERRE *et al.*, 2017). O TEMPO é um radical nitróxido que apresenta um par de elétrons deslocado entre os átomos de N e O. Esse radical nitróxido é apenas um dos componentes do sistema redox obtido a partir de transferências de elétrons (PIERRE *et al.*, 2017). Dentre o sistema redox, conforme ilustrado na Figura 4, o componente que durante a reação atua como agente oxidante é o íon nitrosônio (2), obtido a partir da presença do TEMPO (1). O íon nitrosônio é reduzido ao longo do processo de oxidação em hidroxilamina (3), a qual é regenerada em íon nitrosônio (2) na presença de um co-oxidante (NOOY; BESEMER; BEKKUM, 1995).

FIGURA 4 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ELEMENTOS OBTIDOS A PARTIR DO PROCESSO DE OXIDAÇÃO COM O REAGENTE TEMPO.

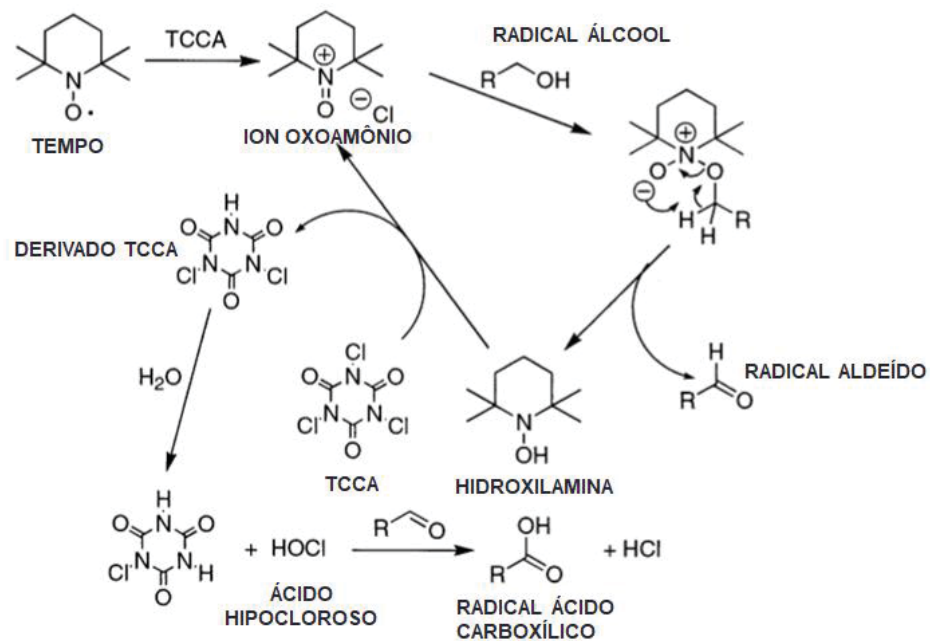


FONTE: Adaptado de Nooy; Besemer; Bekkum (1995).

O NaOCl/NaBr tem sido oco-oxidante mais comumente utilizado para oxidação de polissacarídeos (SAKAKIBARA *et al.*, 2016; DE SOUZA *et al.*, 2011). Contudo, alguns estudos bem sucedidos realizaram o processo de oxidação seletiva com os sistemas TEMPO/lacase (MERLINI *et al.*, 2015) e TEMPO/TCCA (SANTOS-FIDENCIO *et al.*, 2019). O ácido tricloroisocianúrico (TCCA) pertence ao grupo das N-cloroaminas. As cloroaminas são utilizadas como agentes branqueadores, desinfetantes e bactericidas devido as suas propriedades clorantes e oxidantes, sendo comumente aplicadas para purificação de bebidas e agentes sanitizantes de piscinas de banho por serem de fácil manipulação. O TCCA facilmente consegue oxidar material orgânico, sendo que em sistema aquoso, o processo de oxidação se deve a formação de ácido hipocloroso (TILSTAM; WEINMANN, 2002). Dentre as opções de co-oxidantes para serem utilizados junto ao TEMPO, o TCCA se torna uma alternativa interessante por catalisar a reação de maneira branda, simples e homogênea (DOS SANTOS, 2015).

O mecanismo de regeneração e oxidação por TEMPO/TCCA é proposto por Luca *et al.* (2003), em que uma quantidade de TCCA pode reagir com TEMPO formando o íon oxoamônio que reage com álcool (hidroxila primária) originando o aldeído intermediário. A hidroxilamina é reoxidada pelo TCCA ao íon oxoamônio. A hidrólise do TCCA e seu derivado podem formar o ácido hipocloroso que é capaz de oxidar o aldeído intermediário até ácido carboxílico, assim como, o íon oxoamônio reciclado. A partir do conhecimento deste mecanismo, compreende-se que a hidroxila do C-6 dos monossacarídeos é transformada em ácido carboxílico e, portanto, os monossacarídeos neutros em seus respectivos ácidos urônicos.

FIGURA 5 - MECANISMO PROPOSTO DE OXIDAÇÃO PELO SISTEMA TEMPO/TCCA.



FONTE: Adaptado de Luca *et al.* (2003)

A reação de oxidação promovida pelo TEMPO em meio alcalino pode ser aprimorada devido a utilização de KBr ou NaBr à mistura. Isso indica que o ácido hipobromoso é mais reativo do que o ácido hipocloroso (NOOY; BESEMER; BEKKUM, 1995; PIERRE *et al.*, 2017).

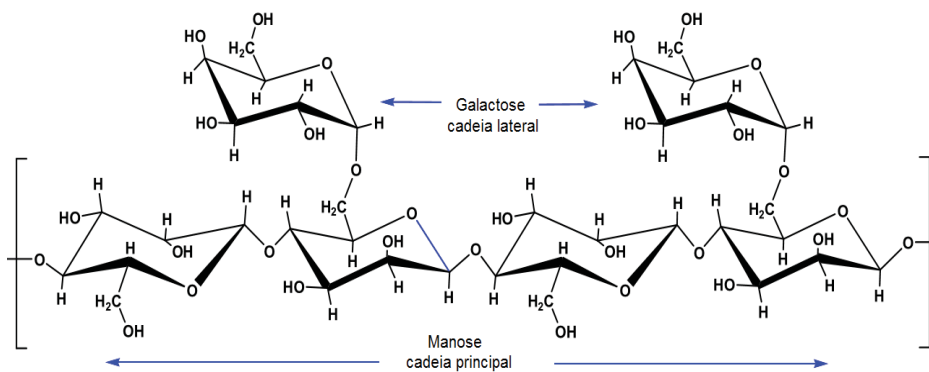
2.9 GOMA GUAR

A goma guar é um polissacarídeo bastante abundante em zonas áridas da Índia, Paquistão, Sudão e USA. Esse polissacarídeo natural é extraído da semente da *Cyamopsis tetragonolobus* da família Leguminosae (THOMBARE *et al.*, 2016). A goma guar apresenta variadas aplicações industriais como no setor têxtil, de cosméticos, de explosivos, como também, no setor alimentício atuando como estabilizante, emulsificante e espessante (GEORGE; SHAH; SHRIVASTAV, 2019; MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2014). Além disso, as características gelificantes e a degradação enzimática da goma guar no cólon intestinal têm a tornado uma molécula promissora em estudos farmacológicos como veículo

de drogas orais. Estudos demonstraram que devido a sua viscosidade, esta goma pode desempenhar um papel significativo na redução do nível de colesterol e glicose, como também, na contribuição para resistência a patógenos e promoção de alívio em doenças intestinais funcionais crônicas. Ademais, a goma guar é biodegradável, biocompatível e apresenta baixa toxicidade. Portanto, é um polímero seguro e interessante para aplicações farmacológicas (GEORGE; SHAH; SHRIVASTAV, 2019).

A goma guar é insolúvel na maior parte dos solventes orgânicos. A água é o solvente mais importante, hidratando o polissacarídeo que confere alta viscosidade mesmo em concentrações baixas. O polímero da goma guar apresenta alta massa molecular, de 1×10^6 a 2×10^6 g/mol, e a sua estrutura consiste em uma cadeia principal formada por unidades de β -D-manopirranose (1 \rightarrow 4) ligadas, parcialmente substituída na posição O-6 por unidades de α -D-galactopirranose, apresentando uma proporção média de 1,6:1 até 2:1 de Manp:Galp (THOMBARE *et al.*, 2016)(FIGURA 6).

FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DA GOMA GUAR.



FONTE: Adaptado de Thombare *et al.* (2016).

Embora as gomas apresentem enormes aplicações, existem algumas desvantagens inerentes que as restringem para determinadas aplicações, sendo necessário submetê-las a algumas modificações químicas (THOMBARE *et al.*, 2016).

3 JUSTIFICATIVA

A heparina é um polissacarídeo formado por unidades dissacarídicas de um ácido urônico e um aminoaçúcar. Esse polímero apresenta importância para a clínica devido a sua ação anticoagulante potente. Porém, esse fármaco apresenta algumas desvantagens, como efeitos colaterais e riscos de contaminação por ser um material oriundo do tecido animal. Estudos visando a obtenção de alternativas à heparina têm sido realizados com polissacarídeos de diferentes fontes. Eles têm apontado que grupamentos sulfato, os quais estão presentes na estrutura da heparina, são grandes contribuintes para a atividade anticoagulante. Os grupamentos sulfato conferem uma característica essencial para a anticoagulação, pois a sua propriedade aniônica possibilita interação com os aminoácidos catiônicos das proteínas inibitórias da cascata de coagulação. Contudo, os grupamentos sulfato não são os únicos resíduos aniônicos na estrutura da heparina. Os ácidos urônicos apresentam em seu C-6 uma carboxila, a qual apresenta carga negativa. Sendo assim, esses grupamentos podem apresentar um papel relevante na promoção da atividade anticoagulante. Estudos com diferentes polissacarídeos demonstraram que a presença dos grupamentos carboxila em estruturas sulfatadas contribuiu para a ação anticoagulante, entretanto, outras pesquisas obtiveram resultado oposto. Diante disso, nota-se que ainda são necessários maiores estudos para elucidar a importância dos grupamentos carboxila na promoção da atividade anticoagulante em polissacarídeos sulfatados.

A goma guar foi o polissacarídeo de escolha para a realização deste trabalho. A sua utilização consta de algumas vantagens como fácil aquisição, por ser um material comercial, e apresentar uma estrutura bem elucidada pela literatura. Estudos anteriores mostraram que após processos de hidrólise parcial e sulfatação química, esta pôde ser absorvida pela via de administração subcutânea demonstrando potencial para ser utilizada como um agente anticoagulante e antitrombótico. Além disso, pesquisas demonstraram que a goma guar é passível de sofrer oxidação seletiva em C-6 utilizando o reagente TEMPO, transformando os monossacarídeos neutros em seus ácidos urônicos correspondentes. Em vista disso, o estudo da goma guar após o processo de hidrólise parcial, carboxilação e sulfatação química se torna bastante interessante ao avaliar se a presença dos grupos carboxila contribui para a atividade anticoagulante.

4 OBJETIVOS

Esse trabalho teve por objetivo avaliar a contribuição de diferentes graus de inserção de grupos carboxila na goma guar parcialmente hidrolisada e, posteriormente, quimicamente sulfatada para promoção da atividade anticoagulante.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Hidrolisar parcialmente a estrutura da goma guar;
- b) Oxidar as hidroxilas livres do C-6 da goma guar visando estruturas com alto e baixo grau de oxidação, utilizando os reagentes TEMPO/TCCA;
- c) Sulfatar quimicamente as frações: hidrolisada, hidrolisada de baixo grau de oxidação e hidrolisada de alto grau de oxidação;
- d) Caracterizar estruturalmente esses polissacarídeos por meio das técnicas de composição monossacarídica, metilação, dosagem de ácidos urônicos, grau de sulfatação, homogeneidade, massa molecular e Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- e) Comparar a atividade anticoagulante entre os diferentes polissacarídeos por meio dos testes de aPTT, PT, TT e ensaio com enzimas da cascata de coagulação (FIIa e FXa);
- f) Avaliar o tempo de duração do efeito anticoagulante promovido pela administração subcutânea dos polissacarídeos em ratos (ensaio *ex vivo*).

ARTIGO I

(Manuscrito será enviado para International Journal of Biological Macromolecules)

***In vitro* and *ex vivo* anticoagulant activity of partially hydrolyzed, oxidized and chemically sulfated guar gum**

Franciê Assis Melo Faria, Carina Boaron, Genilza da Silva Mello, Diogo R. B. Ducatti, Thales Ricardo Cipriani*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Sector of Biological Sciences, Federal University of Paraná, CP 19.046, CEP 81.541-980, Curitiba, PR, Brazil.

* Corresponding author. E-mail address: tcipriani@ufpr.br

ABSTRACT

Guar gum is a galactomannan consisting of a chain formed by (1→4) β-D-mannopyranose units, partially replaced at O-6 by α-D-galactopyranose units. Previous studies with commercial guar gum have shown that this polysaccharide when partially hydrolyzed and sulfated presents a very promising anticoagulant activity. Now, partially hydrolyzed guar gum (GGH) was oxidized in a pH 10 buffered system using the oxidant 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) and co-oxidant trichloroisocyanuric acid (TCCA), to obtain fractions GGHOP and GGHOT, with low and high degree of oxidations, respectively. All samples were chemically sulfated and the derivatives evaluated for anticoagulant activity using aPTT, PT and TT assays. Oxidized and sulfated fractions showed that anticoagulant activity was inversely proportional to the degree of oxidation, and the sulfated but not oxidized derivative GGHS1 showed considerably better results. GGHS1 also showed better anticoagulant activity than the low molecular weight heparin enoxaparin. All fractions had a similar action mode, inhibiting mainly FIIa, especially in the presence of antithrombin. In addition, they were able to respond to the protamine antidote when they present their anticoagulant effect reversed. These results indicate that the presence of uronic acids in partially hydrolyzed and later sulfated guar gum decreased its anticoagulant activity, and that the partially hydrolyzed and chemically sulfated derivative GGHS1 remains the main candidate to anticoagulant agent obtained from guar gum.

Keywords: Heparin, chemical sulfation, guar gum, selective oxidation, TEMPO, uronic acid, anticoagulant activity.

1. INTRODUCTION

Heparin is one of the most used anticoagulants in the clinical area. It is a highly sulfated polysaccharide composed by repeating disaccharides units of α -D-glucosamine and uronic acid (α -L-iduronic or β -D-glucuronic) (POMIN, 2009). Although heparin is very effective, it presents some collateral effects, such as bleeding, thrombocytopenia, in addition to the risk of contamination by pathogens because of its porcine and bovine origin, which can impact manufacturing and availability (CHANDARAJOTI; LIU; PAWLINSKI, 2016). Many studies have been done to correlate the structure of heparin with its anticoagulant activity, and several work shave already proven that the heparin sulfate groups are essential for binding to antithrombin (AT) and heparin cofactor II (HCII), potentiating the inhibitory action of these serpins in coagulation cascade (POMIN, 2009). Because of this, research has been conducted in this direction with naturally and chemically sulfated polysaccharides (MOURÃO, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016; BARDDAL *et al.*, 2020).

In addition to the sulfate, heparin has carboxyl groups in its structure (HOOK *et al.*, 1974). There are still no enough evidences that the carboxyl groups in different polysaccharides are important for anticoagulant activity, but some studies have sought to verify their synergistic relationship with the sulfate groups (CIANCIA; QUINTANA; CEREZO, 2010). Analysis of the anticoagulant activity of heparin without the presence of these carboxylic groups, through esterification (AGARWAL; DANISHEFSKY, 1986) and carboxyl-reduction cycles (WESSEL *et al.*, 1990), showed that there was a significant decrease in the anticoagulant activity. According to Whistler and Kosik (1971), the insertion of carboxyl groups in sulfated chitosan contributed to a higher anticoagulant activity at all levels of sulfate content. According to Santos-Fidencio *et al.* (2019), the oxidation of carrageenan from red algae increases its anticoagulant activity. Although these studies showed that the presence of the carboxyl group seems to have a synergistic action with sulfate groups for the anticoagulant activity, a study with citrus pectin showed that carboxyl-reduction followed by chemical sulfation gave rise to a more potent anticoagulant than that

obtained only by sulfating citrus pectin (MAAS *et al.*, 2012). Thus, further studies are still required to evaluate the importance of carboxyl groups for anticoagulant activity in different polysaccharides.

Guar gum is a galactomannan processed from the endosperm of *Cyamopsis tetragonolobus*, with a main chain of (1→4)-linked β-D-manopyranose units, partially substituted at O-6 by non-reducing terminals of α-D-galactopyranose. Previous studies with commercial guar gum have shown that this polysaccharide when partially hydrolyzed and sulfated presents a very promising anticoagulant activity, with the possibility of being administered subcutaneously, as occurs with low molecular weight heparins (BARDDAL *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2005). In addition, guar gum is already commercialized, which contributes to its easy acquisition, as well as having a well-known structure (PRABAHARAN, 2011; THOMBARE *et al.*, 2016). Therefore, studies on chemical modification of this polymer, such as carboxylation and sulfation, are relevant.

Regarding to the evaluation of the carboxylation of polysaccharides, the compound N-oxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TEMPO) has an oxidizing capacity on primary polysaccharide hydroxyl (NOOY *et al.*, 1995). It can perform selective C-6 oxidation in guar gum, inserting carboxylic groups and converting monosaccharide units into its respective uronic acid derivative (CRESCENZI *et al.*, 2004; SAKAKIBARA *et al.*, 2016). TEMPO presents some advantages in relation to the other oxidizing agents such as high conversion rate, high selectivity, fast reaction and low cost (PIERRE *et al.*, 2017). In addition, TEMPO can be used in small quantities because it is continuously regenerated *in situ* by a co-oxidant (DOS SANTOS, 2015). A very interesting co-oxidant agent, that could be used in these reactions, is trichloroisocyanuric acid (TCCA), because it presents chemoselectivity, low cost and commercial availability (ZOLFIGOL; SHIRINI; CHOGHAMARANI, 2006).

Knowing the anticoagulant action of chemically sulfated derivatives from guar gum, and lacking elucidation about the role of uronic acids in this molecule, this study aims to evaluate the effect of inserting carboxylic groups, in addition to sulfate groups, in partially hydrolyzed guar gum, through total and partial oxidation of C-6 mediated by TEMPO/TCCA, on the anticoagulant activity.

2. EXPERIMENTAL

2.1 MATERIAL

Commercial guar gum (GG) obtained from SIGMA-ALDRICH (G4129; lot SLBR9824V); unfractionated heparin (6th International Standard); enoxaparin (Eurofarma; Versa®; lot 558657A); sulfur trioxide pyridine complex 98%, lot STBD4209V, obtained from SIGMA-ALDRICH (S7556-25G; lot STBD4209V); TEMPO obtained from SIGMA-ALDRICH (214000-5G; lot BCBL2687V).

2.2 METHODS

2.2.1 Partial Hydrolysis

Several hydrolysis conditions, varying the acid, molarity and reaction time, were carried out in order to obtain a low molecular weight fraction, with high yield (Table 1). Then, GG (5 g) was partially hydrolyzed with 0.1 M HCl (600 mL) at 100 °C for 1 h. The solution was neutralized with 5 M NaOH, concentrated in rotary evaporator and dialyzed for 2 days against current water and 2 days against distilled water (5 exchanges), using a 3.5 kDa cut-off membrane. After, it was freeze-dried to give the partially hydrolyzed GG (GGH).

2.2.2 Selective Oxidation

Some conditions of oxidation, based on Nooy *et al.*(1995) and Santos-Fidencio *et al.*(2019), were previously carried out on GG, using N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) as oxidant agent and tricloroisocianuric acid (TCCA) as co-oxidant agent (Table 2). Then, GGH was used to give rise to two oxidized fractions: one with low degree of oxidation and another with high degree of oxidation. Two portions of GGH (1 g each) were separately solubilized in 125 mL of 0.4 M NaHCO₃/Na₂CO₃ buffer solution, pH 10. For each

mol of primary alcohol in GGH, 0.1 mol of TEMPO (in 5 mL of buffer solution), 0.4 mol of KBr (in 20 mL of buffer solution), and 0.2 or 1.5 mols of TCCA (in 150 mL of buffer solution) for low and high oxidations, respectively, were used. Then, the reactions occurred in refrigerator (4 – 8 °C) for 15 h. To finish the reactions, excess of ethanol (approximately 2.5 mL) was added. After 5 min stirring, 5 mols of NaBH₄ per mol of primary alcohol in GGH were added. After 10 min stirring, pH was adjusted to 7 with 4 M HCl, the material was dialyzed 2 days against distilled water (6 exchanges), using a 3.5 kDa cut-off membrane, and freeze-dried. The fractions with low and high degree of oxidation were named GGHOP and GGHOT, respectively.

2.2.3 Chemical Sulfation

GGH, GGHOP and GGHOT were chemically sulfated according to the methods described by Larm; Larsson and Scholander (1979) with some modifications proposed by Román Ochoa *et al.* (2017). Each polysaccharide (200 mg) was solubilized in 10 mL of N,N-dimethylformamide (DMF) (solution A). SO₃-pyridine complex, in a proportion of 18 mols per mol of free hydroxyl of the polysaccharides, was also solubilized in 10 mL of DMF (solution B). These solutions were shaking overnight. Solution A was then added to the solution B (final total reaction volume to weight of sample of 10 mL:100 mg). The reactions were carried out for 6 h at 25 °C, then neutralized with 10% aq. NaHCO₃, dialyzed 3 days against distilled water (8 exchanges) using a 3.5 kDa cut-off membrane, concentrated in rotary evaporator, and freeze-dried. This process resulted in the samples GGHS1, GGHOPS1 and GGHOTS1.

A second sulfation process, with some differences, was performed according to De Araujo *et al.* (2013) seeking high solubility of the oxidized materials in DMF. Before the sulfation process, the oxidized polysaccharides were transformed in triethylammonium salts. GGHOP (120 mg) and GGHOT (200 mg) were treated with cation exchange resin in triethylammonium form (1.2 g and 2 g, respectively). The material was stirred for 16 h at room temperature, filtered, dialyzed 2 days against distilled water (5 exchanges) using a 3.5 kDa cut-off membrane, and freeze-dried. The resulting triethylammonium salts of GGHOP and GGHOT, besides the native GGH (150 mg), were chemically sulfated. Each polysaccharide was solubilized in DMF in a proportion of 10 mL to 100 mg of sample. The

mixtures were tightly closed, stirred at 70 °C for 3 h, and at room temperature overnight. After, SO₃-pyridine complex was added in the reaction in a proportion of 9 mols per mol of free hydroxyl of the polysaccharides. The reactions were carried out for 6 h at 25 °C, then neutralized with 10% NaHCO₃, dialyzed 3 days against distilled water (8 exchanges) using a 3.5 kDa cut-off membrane, concentrated in rotary evaporator, and freeze-dried. This second sulfation process resulted in the samples GGHS2, GGHOPS2 and GGHOTS2.

2.2.4 Structural Analysis of Polysaccharides

2.2.4.1 Homogeneity and *M_w*

The homogeneity profile and molecular weight (*M_w*) of the polysaccharides was determined by high performance size exclusion chromatography (HPSEC) HPSEC analyses were performed using four ultrahydrogel columns in series, with exclusion sizes of 7 x 10⁶, 4 x 10⁵, 8 x 10⁴, and 5 x 10³ Da, and refractive index, UV (280 nm) and multi-angle laser light scattering detectors. The eluent was 0.1 M NaNO₂ containing 200 ppm aq. NaN₃ at a flow of 0.6 mL/min. The sample was solubilized in the same solution used as eluent, at a concentration of 1 mg/mL, filtered through a 0.22 μm membrane and injected (100 μL loop) to acquire the homogeneity profile. The peak elution time of each polysaccharide was compared with a calibration curve obtained with standard dextrans of 266, 124, 72.2, 40.2, 17.2, 9.4 and 5 kDa from Sigma.

2.2.4.2 NMR spectroscopy

2D-NMR HSQC-DEPT correlation maps were obtained with a Bruker 600 MHz AVANCE IINMR spectrometer, with a 5 mm inverse gradient probe head. Analyses were carried out at 70 °C, on samples (20 mg) dissolved in D₂O (500 μL). Chemical shifts (δ) were expressed in ppm, relative to acetone at δ 30.2/2.21 (¹³C/¹H).

2.2.4.3 Degree of oxidation

The degree of oxidation (DOx) was calculated by colorimetric analysis. The amount of uronic acids in polysaccharides was determined according to Filisetti-Cozzi and Carpita (1991). A solution containing a known amount of polysaccharide (400 μL), 40 μL of a 4 M potassium sulfamic acid-sulfamate (pH 1.6) and 2.4 mL of sodium tetraborate (75 mM in H_2SO_4) were mixed. The mixture was incubated in a boiling water bath for 20 min. After cooling, 80 μL of *m*-hydroxybiphenyl (0.15% w/v in NaOH 0.5% w/v) were added. The presence of uronic acids was visualized by the appearance of a pink color, read at 525 nm, and compared with a calibration curve of galacturonic acid. Then, the DOx (%) was calculated considering the number of primary hydroxyls per monosaccharide in GGH (approximately 2 primary hydroxyls per each 3 monosaccharides = $2/3$ or 0.66), according to Eq. (1).

$$\text{DOx} = \frac{\% \text{ of uronic acid}}{0.66} \quad \text{Eq. (1)}$$

2.2.4.4 Methylation analysis

The methylation analysis was carried out using NaOH- Me_2SO -MeI according to Ciucanu and Kerek (1984). The polysaccharides (5 - 10 mg) were solubilized in Me_2SO (0.5 mL), followed by addition of NaOH (200 mg) and CH_3I (0.5 mL). The mixtures were vortexed for 30 min and then left at rest overnight. After, more Me_2SO (1 mL) and CH_3I (1 mL) were added and the mixture were vortexed again for 30 min and then left at rest overnight in order to ensure a complete methylation of the polysaccharide. The mixtures were then neutralized with HOAc, dialyzed 3 days against distilled water (8 exchanges) using a 3.5 kDa cut-off membrane, and freeze-dried. The per-*O*-methylated derivatives were hydrolyzed with 0.25 mL of 50% H_2SO_4 at 0 $^\circ\text{C}$ for 1 h, followed by dilution to 5.5% v/v, and heating at 100 $^\circ\text{C}$ for 16 h. The resulting mixtures of *O*-methyl aldoses were neutralized with BaCO_3 , filtered, and reduced with NaBD_4 (2 mg; pH \sim 10) overnight. The materials were then neutralized with HOAc, freeze-dried, and the resulting boric acid removed as trimethyl borate by co-evaporation with MeOH. After, acetylation was carried out with Ac_2O -pyridine (1:1, v/v; 1 mL) at room temperature, overnight. The samples were analyzed by GC-MS (Shimadzu model QP2020NX, quadrupole detector) using a VF-5MS column (30m x 0.25 mm), held at 100 $^\circ\text{C}$ for 3 min, then programmed at 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ to 220 $^\circ\text{C}$ (held for 3 min), then 250 $^\circ\text{C}$ (held for 3 min) and 280 $^\circ\text{C}$ (held for 3 min) (runtime of 30 min), with helium as carrier gas (2

mLmin⁻¹). Components were identified by their typical retention times and electron ionization mass spectra relative to partially *O*-methylated alditol acetates prepared from standard monosaccharides (Sigma-Aldrich), according to SASSAKI *et al.* (2005).

2.2.4.5 DS analysis of the sulfated polysaccharides

The inorganic sulfate released from acid hydrolysis of the sulfated polysaccharides, with 1 M HCl at 105-110 °C for 5 h, was quantified by the BaCl₂-gelatin turbidimetric method (Dodgson and Price, 1962), using Na₂SO₄ as standard. Sulfur percentage (S%) in the sulfated polysaccharides was calculated from the inorganic sulfate content. Then, the degree of substitution (DS) was obtained according to Eq. (2) (Whistler and Spencer, 1964), where Mm is the weighted mean of molecular weights of the monosaccharides in the polysaccharides. For oxidized derivatives, the content of uronic acids was considered. Thus, Mm = 162.0, 164.5 and 168.9 for GGH, GGHOP and GGHOT, respectively.

$$DS = \frac{Mm \times S\%}{3200 - (102 \times S\%)} \quad \text{Eq. (2)}$$

2.2.5 Anticoagulant Activity

Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT), Prothrombin Time (PT) and Thrombin Time (TT) were determinate with aPTT-SP, PT-Fibrinogen HS and TT-Fibrinogen HS PLUS Hemosil® kits, respectively (Instrumentation Laboratory Company – Bedford, MA 01730-2443 USA), in a COAG-AMATE XM coagulometer (Organon Teknika Corporation, Durhan, NC), using a pool of normal citrated sheep plasma. For aPTT assay, plasma (50 µL) was incubated with positive control (unfractionated heparin or enoxaparin), negative control (saline) or polysaccharide at different concentrations (50 µL) at 37 °C. aPTT was also employed to evaluate the effect of protamine (Sigma) on inhibition of the anticoagulant activity of the polysaccharides. In this case, plasma (50 µL) was incubated for 60 s with 25 µL of polysaccharide solution plus 25 µL of protamine solution at the same concentration. After 60 s, aPTT reagent was added (50 µL) and incubated for 180 s. Finally, 25 mM CaCl₂ (50 µL) was added and the clotting time measured. For PT assay, plasma (30 µL) was incubated with

positive control (unfractionated heparin or enoxaparin), negative control (saline) or polysaccharide at different concentrations (20 μL) at 37 °C for 180 s. PT reagent (100 μL) was then added and the clotting time measured. For TT assay, plasma (80 μL) was incubated with positive control (unfractionated heparin or enoxaparin), negative control (saline) or polysaccharide at different concentrations (20 μL) at 37 °C for 60 s. After, 100 μL of TT reagent (3.0 UNIH/mL) were added and the clotting time measured. For each test, mean \pm standard error of mean (SEM) was determined (n = 4).

2.2.6 α -Thrombin and Factor Xa Activities

The assays were performed in 96-well plates and were determined adding 25 μL of each compound with a defined concentration in TS/PEG buffer (0.02 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl, and 1.0 mg/mL polyethylene glycol 8000, pH 7.4). The final concentrations of the reactants were 100 nM antithrombin (AT) or 15 nM heparin cofactor II (HCII), 6 nM α -thrombin or 8 nM factor Xa (Haematologic Technologies Inc., Essex Junction, VT, USA), 100 μM chromogenic substrate S-2238 for α -thrombin and S-2222 for factor Xa (Chromogenix AB, Molndal, Sweden), 1 $\mu\text{g/mL}$ for positive control (unfractionated heparin and enoxaparin) and 0.01, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/mL}$ of sulfated polysaccharides. Sulfated polysaccharide, serpins (AT or HCII), and enzymes (α -thrombin or factor Xa) were incubated for 1 min at 37 °C, then 25 μL of specific chromogenic substrate were added, totalizing 100 μL and the absorbance at 405 nm was recorded over 15 min in a BioTek™ Epoch™ Microplate Spectrophotometer. The enzymatic activities were calculated from the slope of the linear segment of the plot of absorbance, according to what was shown by Román Ochoa *et al.* (2017), which represents the initial velocity of reaction. For each test (n = 3), the enzymes residual activity, mean \pm standard error of mean (SEM), was determined. Assays without serpins were also performed. In the absence of sulfated polysaccharides and serpins, the enzymes activities were considered 100%.

2.2.7 Animals

Experiments were conducted with male Wistar rats (190 - 210 g) from the colony of Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil. They were maintained under standard laboratory conditions (12 h light/dark cycle, temperature 22 ± 2 °C), with standard pellet food and water *ad libitum*. The animals were anesthetized with an intramuscular injection of a mixture of ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine (16 mg/kg). The Institutional Ethics Committee of Federal University of Paraná approved all the procedures adopted in this study (authorization number 1369).

2.2.8 *Ex Vivo* aPTT

The assay was carried out with Wistar rats ($n = 3$ per group). Citrated blood samples were collected (600 μ L of blood in 100 μ L of 3.8% sodium citrate) from the carotid artery 1, 2, 3 and 6 h after subcutaneous administration (dorsal region) of 2 mL of vehicle (saline), enoxaparin (20 mg/kg) or sulfated polysaccharides (20 - 100 mg/kg), according to Barddal *et al.* (2020). For blood collection, the animals were anesthetized for cannulation of the right carotid artery. Then, the blood was centrifuged at 3000 rpm for 10 min to obtain the citrated plasma. In order to determine the aPTT, 50 μ L of the plasma was incubated for 60 s at 37 °C. Then, aPTT reagent was added (50 μ L) and incubated for 180 s. Finally, 25 mM CaCl₂ (50 μ L) was added and the clotting time measured. For the times of 1, 2 and 3 h, the same animals were used. For the time of 6 h, another group of animals was necessary, to avoid keeping the animals anesthetized for a long time.

2.2.9 Statistical Analysis

Results were expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM) and statistical significance of the results was determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test, using Graphpad Prism 6 software. Data were considered statistically different at a significance level of $p < 0.05$.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 PARTIAL ACID HYDROLYSIS OF GUAR GUM

Polysaccharides with lower molecular weight are more easily absorbed by subcutaneous administration. This occurs with low molecular weight heparins and has also been verified for sulfated derivative of guar gum (BARDDAL *et al.*, 2020). In order to obtain a lower molecular weight polymer, GG ($M_w > 266 \times 10^3$ g/mol) was submitted to partial acid hydrolysis. Several hydrolysis conditions were carried out in order to obtain a low molecular weight fraction, with high yield (Table 1). In this sense, the condition 8, with 0.1 M HCl at 100 °C for 1 h, was chosen for large-scale application, which originated GGH (Fig. 1).

Table 1. Conditions of partial acid hydrolysis of GG with yield and Mw of GGHS.

Condition	Acid	Molarity (M)	Reaction time (min)	Dialysis membrane cut off (g/mol x 10 ³)	Yield ^a (%)	Mw ^b (g/mol x 10 ³)
1	TFA	0.5	120	6-8	2.2	< 5.00
2	TFA	0.5	120	3.5	2.7	6.26
3	HCl	0.27	60	6-8	4.7	Nd
4	HCl	0.13	60	6-8	14.5	Nd
5	HCl	0.1	30	6-8	60.7	36.13
6	HCl	0.05	60	6-8	51.7	40.59
7	HCl	0.1	45	3.5	55.4	19.04
8	HCl	0.1	60	3.5	47.6	12.24

Reactions occur at 100 °C, with a sample weight to solution volume ratio of 8.3mg/mL.

^a Yields were calculated after dialysis and freeze drying.

^b Mw was determined by comparison with a calibration curve obtained with standard dextrans.

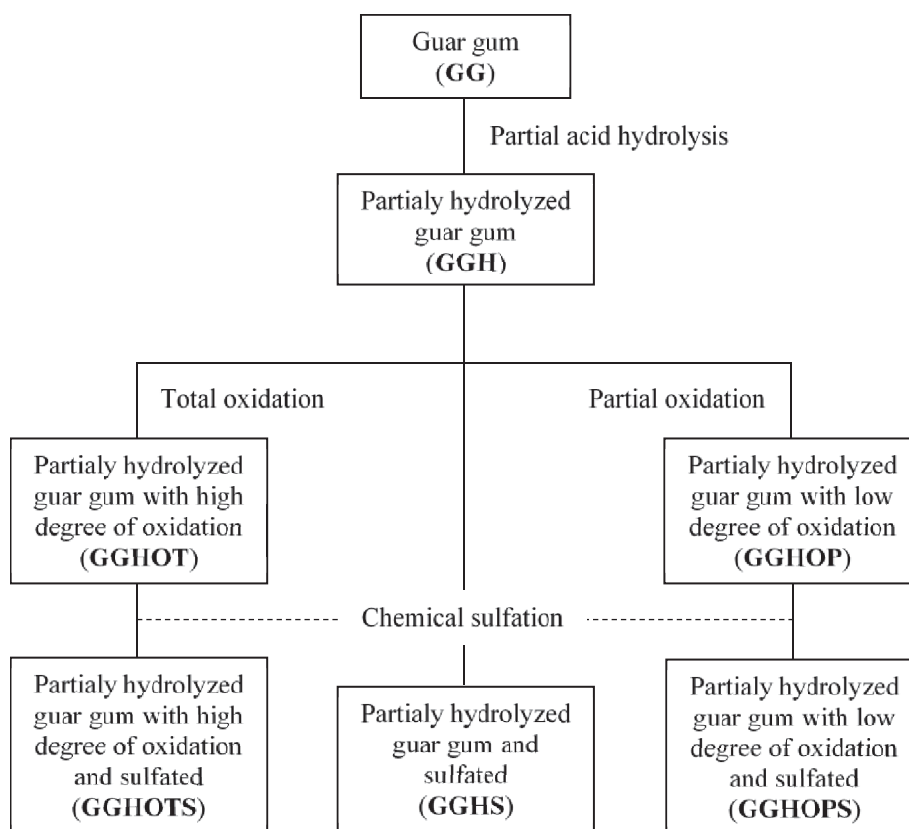


Fig.1. Scheme for obtaining partially hydrolyzed, oxidized and sulfated derivatives of guar gum.

HPSEC analysis (Fig. 2A) showed that the partial acid hydrolysis process was successful. From 5 g of GG, 3.05 g of GGH (61.06% yield; $M_w = 14.7 \times 10^3$ g/mol) were obtained. According to methylation analysis, GG and GGH are galactomannans with a main chain of (1→4)-linked Man p units (methylated derivative 2,3,6-Me $_3$ -Man p ; 21.68% and 30.02%, respectively), partially substituted at O-6 (2,3-Me $_2$ -Man p ; 38.85% and 36.32%, respectively) by single Gal p units (2,3,4,6-Me $_4$ -Gal p ; 39.47% and 33.66%, respectively). The Man:Gal ratio of GG and GGH were 1.53:1 and 1.97:1, respectively. The higher mannose to galactose ratio of GGH indicates that the partial acid hydrolysis probably removed terminals of galactose.

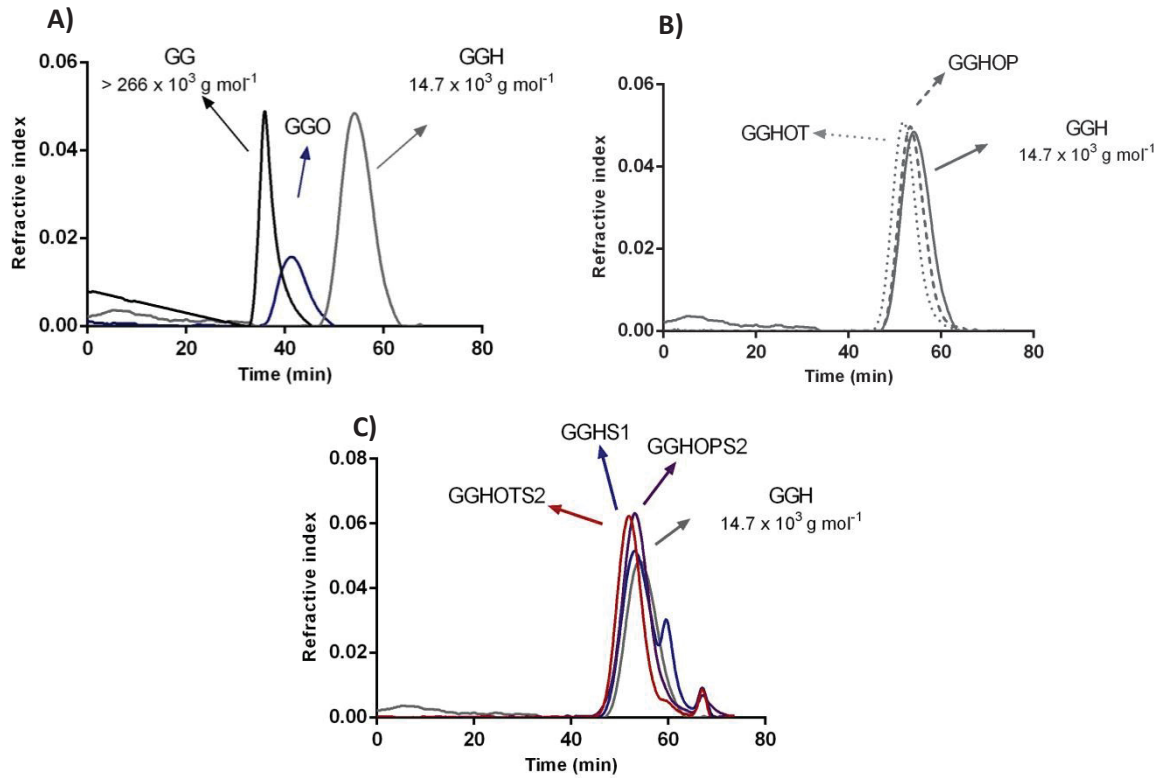


Fig. 2. HPSEC elution profile and Mw of the native fraction and derivatives obtained after hydrolysis (A), oxidation (B) and sulfation (C). GG: commercial guar gum; GGH: partially hydrolyzed guar gum; GGO: oxidized guar gum; GGHS1: partially hydrolyzed sulfated; GGHOP: partially hydrolyzed with low degree of oxidation; GGHOT: partially hydrolyzed with high degree of oxidation; GGHOPS2: partially hydrolyzed with low degree of oxidation sulfated; GGHOTS2: partially hydrolyzed with high degree of oxidation sulfated. Mw values were determined by comparison with a calibration curve obtained with standard dextrans.

In addition, $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC of GG and GGH (Fig. 3A and B; Table 2) showed characteristics signals of galactomannan (CRESCENZI *et al.*, 2004). C1/H1 correlation of α -D-Galp and β -D-Manp were observed at δ 98.8/5.02 and 100.0/4.74 ppm in GG, respectively, and at δ 98.8/5.00 and 100.1/4.70 ppm in GGH, respectively. C4/H4 correlation of (1 \rightarrow 4)-linked Manp units was observed at δ 76.8/3.90 ppm in GG and δ 76.7/3.84 ppm in GGH. Substituted C6/H6 of branched units of β -D-Manp were observed at δ 66.7/3.96 and 66.7/3.81 ppm in GG and δ 66.5/3.95 and 66.5/3.79 ppm in GGH. Moreover, GGH exhibited C1/H1 correlations of reducing end-units at δ 93.79/5.16 ppm (α -Manp) and δ 93.74/4.88 ppm (β -Manp) (SASSAKI *et al.*, 2014), which corroborates with its low molecular weight.

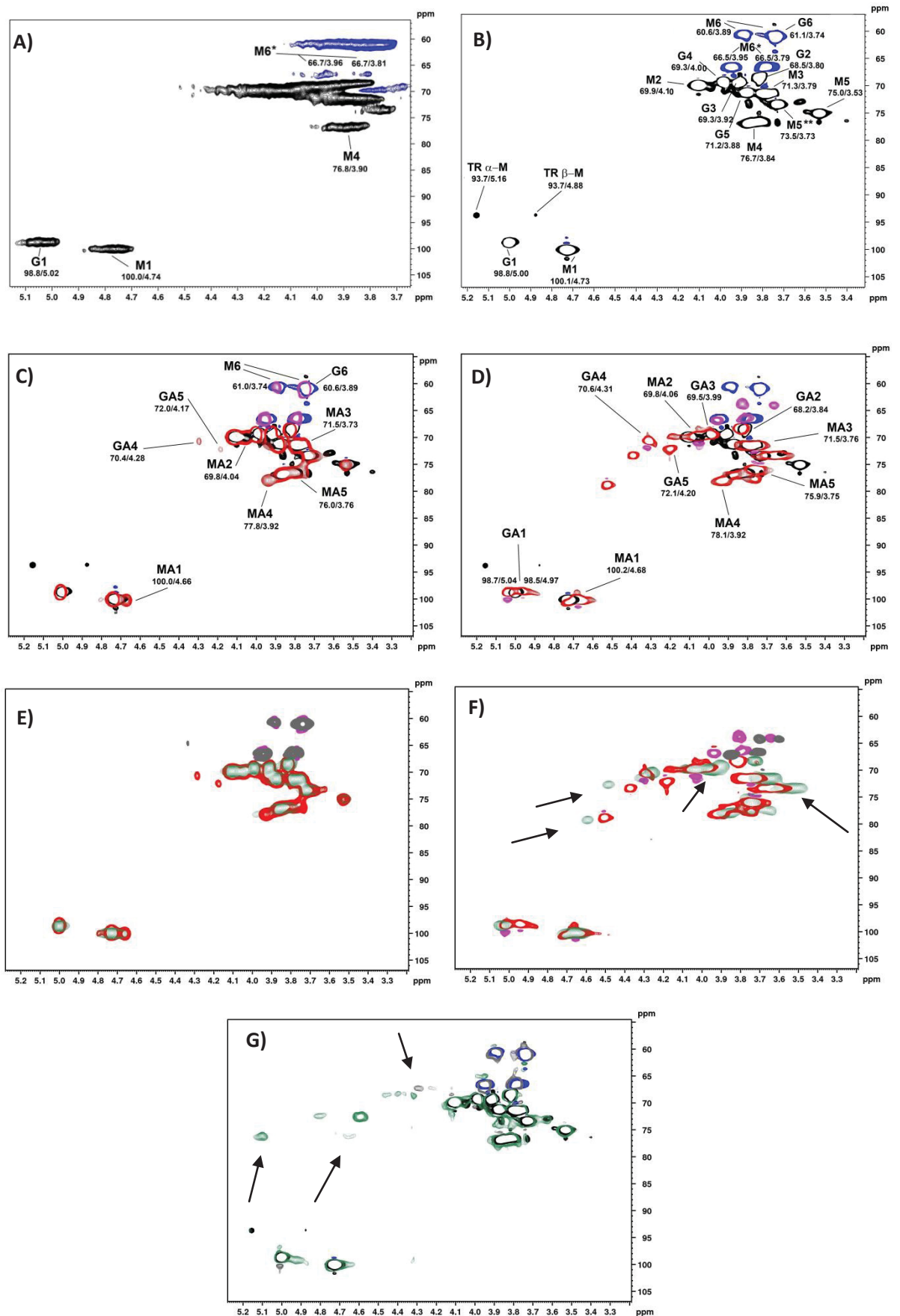


Fig. 3. $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -edited-HSQC spectrum in D_2O , at 70°C , of the native fraction and derivatives. GG (A); GGH (B); overlapping GGH and GGHOP (C); overlapping GGH and GGHOT (D); overlapping GGHOP and GGHOPS2 (E); overlapping GGHOP and GGHOPS2 (F); overlapping GGHOP and GGHOPS2 (G).

(E); overlapping GGHOT and GGHOTS2 (F); overlapping GGH and GGHS1 (G). *substituted M6; **M5 of 6-O-substituted Manp units. GGH: in black (positive) and blue (negative) correlations. GGHOP and GGHOT: in red (positive) and pink (negative) correlations. GGHS1, GGHOPS2 and GGHOTS2: in green (positive) and gray (negative) correlations. G: α -D-Galp units; M: β -D-Manp units; GA: α -D-GalpA units; MA: β -D-ManpA units, TR: reducing end-units. Numbers are correlated with the respective carbon/hydrogen.

Table 2. $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ - HSQC chemical shifts of GGH, GGHOT AND GGHOP expressed as δ (ppm).^a

	GGH		GGHOT ^b			GGHOP			
	G	M	GA	MA	M	G	GA	MA	M
C1/H1	98.8/5.00	100.1/4.70	98.7/5.04; 98.5/4.97	100.2/4.68	o.v.	98.8/5.00	o.v.	100.0/4.66	99.9/4.73
C2/H2	68.5/3.80	69.9/4.10	68.2/3.84	69.8/4.06	o.v.	68.2/3.81	o.v.	69.8/4.04	69.8/4.10
C3/H3	69.3/3.92	71.3/3.79	69.5/3.99	71.5/3.76	o.v.	69.5/3.91	o.v.	71.5/3.73	71.4/3.78
C4/H4	69.3/4.00	76.7/3.84	70.6/4.31	78.1/3.92	77.1/3.87	69.2/3.99	70.4/4.28	77.8/3.92	76.7/3.85
C5/H5	71.2/3.88	75.0/3.53	72.1/4.20	75.9/3.75	n.d.	71.1/3.88	72.0/4.17	76.0/3.76	74.9/3.53
C5/H5**	-	73.5/3.73	-	-	73.4/3.65	-	-	-	73.1/3.71
C6/H6	61.1/3.74	60.6/3.89; 3.74	-	-	-	60.6/3.89	-	-	61.0/3.89; 3.74
C6/H6*	-	66.5/3.95; 3.79	-	-	66.8/3.97; 66.5/3.81	-	-	-	66.6/3.93/ 66.2/3.78

G: α -D-Galp units; M: β -D-Manp units; GA: α -D-GalpA units; MA: β -D-ManpA units.; o.v.: overlapping signal; n.d.: not detected.^a Assignments are obtained on $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ edited - HSQC, at 70 °C in D_2O , based on Crescenzi *et al.* (2004), Ponzini *et al.* (2019) and Cunha *et al.* (2009). Chemical shifts were expressed relative to acetone at δ 30.2/2.21 ($^{13}\text{C}/^1\text{H}$). ^bPresented signal not identified at δ 78.7/4.52, 73.3/4.39, 63.8/3.83 and 64.0/3.67. *C6/H6 substituted of Manp units. ** C5/H5 of 6-O-substituted Manp units.

3.2 SELECTIVE OXIDATION OF GUAR GUM

The C-6 oxidation conditions were started with the native polysaccharide GG, because we thought that this process could cause a reduction in the molecular weight, avoiding the need for partial acid hydrolysis. Some conditions, based on Nooy *et al.* (1995) and Santos-Fidencio *et al.* (2019), were evaluated and are listed in Table 3.

In the condition 1, pH 10 was controlled by dripping NaOH solution (0.5 M) and the reaction time was 20 min in ice bath. The following conditions were carried out in buffer solution, pH 10, in order to maintain pH stability. With 0.1 mol of TEMPO per mol of primary alcohol in the polysaccharide (SANTOS-FIDENCIO *et al.*, 2019), at 4 – 8 °C by 15 h (condition 4), a maximum degree of oxidation was reached. However, the oxidation process did not significantly reduce the molecular weight of GG, with the oxidized fraction (GGO) still showing a low elution time in HPSEC with $M_w > 266 \times 10^3$ g/mol (Fig. 2A). Therefore,

the oxidation process was carried out with GGH, using the same conditions described in 4, resulting in the oxidized derivative GGHOT performed in condition 5 (DOx = 74%). And, to obtain a low degree of oxidation, the amount of TCCA was reduced from 1.5 mol per mol of primary alcohol in the polysaccharide to 0.2 (condition 6), as suggested by Santos-Fidencio *et al.* (2019), resulting in the oxidized derivative GGHOP (DOx = 27%).

$^{13}\text{C}/^1\text{H}$ SQC analyses of the oxidized samples (Fig. 3C and D; Table 2) show less intense correlation of C6/H6 of unbranched Manp and Galp units, at δ 60.6/3.89; 3.74 and δ 61.1/3.74, in GGHOP than in GGH, and absence of this correlation in GGHOT, confirming the low and high degrees of oxidation of the fractions. Moreover, HPSEC elution profiles of the oxidized samples were similar to that of GGH, indicating no depolymerization during oxidation (Fig. 1B).

Table 3. Selected oxidation reactions using guar gum as substrate.

Condition	Sample	TEMPO*	TCCA*	Temperature	Time of reaction	DOx ^a (%)	Yield (%)
1	GG	6.5 mmol	1.5 mol	< 0°C	20 min	38	87.6
2	GG	6.5 mmol	1.5 mol	30°C	15 h	23	115.0
3	GG	0.1 mol	1.5 mol	< 0 °C	6 h	58	111.8
4	GG	0.1 mol	1.5 mol	4 – 8 °C	15 h	100	99.2
5	GGH	0.1 mol	1.5 mol	4 – 8 °C	15 h	74	97.8
6	GGH	0.1 mol	0.2 mol	4 – 8 °C	15 h	27	87.1

* Molarity ratio per mol of primary OH of the sample.

^a Degree of oxidation (DOx) was determined from the uronic acid quantified by the colorimetric method of Filisetti-Cozzi and Carpita (1991).

3.3 CHEMICAL SULFATION OF GGH AND OXIDIZED FRACTIONS

Chemical sulfation was performed according to Larm; Larsson and Scholander (1979) with some adaptations suggested by Román Ochoa *et al.* (2017), resulting in the fractions GGHS1, GGHOPS1 and GGHOTS1. The oxidized and sulfated fractions (GGHOPS1 and GGHOTS1; Table 4) showed lower DS and anticoagulant activity than expected. According to Yang *et al.* (2005), the hydrogen bond between carboxyl and OH groups in polysaccharides containing uronic acids can interfere with the sulfation process, resulting in low DS.

Moreover, the oxidized fractions did not become fully soluble in DMF. Therefore, the sulfation process was repeated with modifications suggested by De Araujo *et al.* (2013). GGHOP and GGHOT were then transformed in triethylammonium salts, blocking the anionic carboxyl groups, to improve their solubility in DMF. Following the sulfation process, GGHS2, GGHOPS2 and GGHOTS2 were obtained. The sulfation agent (SO₃-pyridine complex) was used in a molar ratio of 18:1 and 9:1 (sulfation agent to hydroxyl group on the polysaccharide) in the first and second sulfation processes, respectively, in order to evaluate the effect of the amount of sulfation agent on DS and anticoagulant activity.

The DS values of GGHS1 and GGHS2 were 0.52 and 0.29 respectively (Table 4), indicating that the sulfation process is favored with a greater amount of sulfation agent. In relation to the oxidized fractions, GGHOPS2 and GGHOTS2 had higher DS values (0.38 and 0.43, respectively) compared to GGHOPS1 and GGHOTS1 (0.15 and 0.20, respectively) (Table 4), indicating that previous treatment with triethylammonium results a greater solubility in DMF and contribute to improves the sulfation of the oxidized polysaccharides.

Table 4. Chemical sulfation of GGH and oxidized fractions.

Sample	Sulfated derivative	Yield (%)	DS	Anticoagulant potency (%) [*]
GGH	GGHS1	110.0	0.52	7.71
GGHOP	GGHOPS1	97.8	0.15	0.65
GGHOT	GGHOTS1	84.7	0.20	0.20
GGH	GGHS2	95.3	0.29	2.67
GGHOP	GGHOPS2	86.0	0.38	0.77
GGHOT	GGHOTS2	84.4	0.43	0.29
Heparin	-	-	-	100
Enoxaparin	-	-	-	6.22

S1: sulfation agent was used in a molar ratio of 18:1 (SO₃-pyridine complex to hydroxyl group on the polysaccharide); S2: sulfation agent was used in a molar ratio of 9:1 (SO₃-pyridine complex to hydroxyl group on the polysaccharide). To obtain GGHOPS2 and GGHOTS2, the oxidized fractions were previously transformed in triethylammonium salts, aiming to increase solubility in DMF.

^{*} Anticoagulant potency was determined from the slope of the linear plot of aPTT curves, where the slope of the heparin curve was considered 100%.

In general, HPSEC elution profiles of the sulfated samples were similar to that of GGH, indicating no depolymerization during sulfation (Fig. 1C). Only GGHS1 presented a

heterogeneous elution profile, with a smaller second peak probably from reaction components that were not eliminated on dialysis. $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC analyses of sulfated samples corroborate the low DS values observed. The insertion of sulfate groups in the polysaccharides contributing only to a discrete shifting of signals, as indicated by arrows in Fig. 3E, F and G.

3.4 ANTICOAGULANT ACTIVITY AND MODE OF ACTION

Anticoagulant activity of the sulfated polysaccharides was determined by evaluating their property to increase aPTT, PT and TT of citrated sheep plasma. Dose-response curves were obtained by linear regression. The slope of the aPTT dose-response curves (Fig. 4) was used to calculate the anticoagulant potency of the polysaccharides (Table 4), where the slope of the heparin curve was considered 100%.

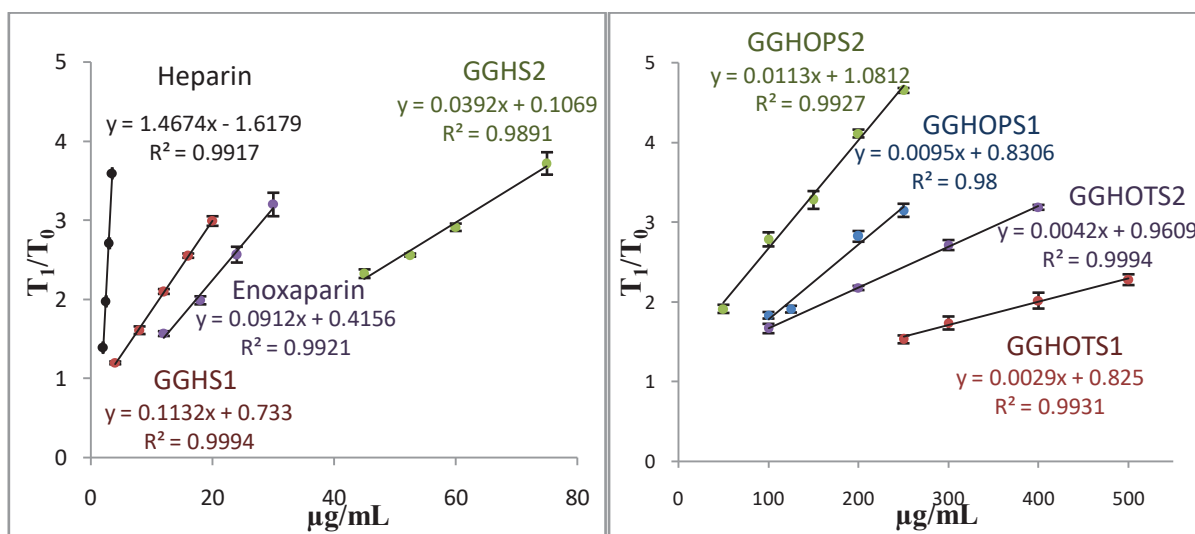


Fig. 4. Effect of the sulfated polysaccharides on aPTT of citrate sheep plasma. T_0 : aPTT (s) in the absence of polysaccharide (saline group); T_1 : aPTT (s) in presence of polysaccharide. Results are expressed as mean \pm SEM (n=4).

As already described above (section 3.3), the oxidized fractions obtained from the second sulfation process (GGHOPS2 and GGHOTS2) showed higher DS compared to GGHOPS1 and GGHOTS1. They also showed higher anticoagulant potency (Table 4 and Fig. 4), indicating that for these polysaccharides DS is directly proportional to anticoagulant

activity, and that the transformation of oxidized polysaccharides in triethylammonium salts, before the sulfation process, is important for this result.

The non-oxidized fraction showed better anticoagulant activity in the first sulfation process (GGHS1), in which the molar ratio of sulfation agent was higher (18:1 against 9:1; sulfation agent to hydroxyl group on the polysaccharide). Here, DS was also directly proportional to anticoagulant activity (Table 4 and Fig. 4).

Analyzing the second sulfation process, where all fractions were soluble in DMF, the anticoagulant potency was GGHS2 > GGHOPS2 > GGHOTS2, while the DS was GGHS2 < GGHOPS2 < GGHOTS2. Even resulting in derivatives with higher sulfate content, GGH oxidation led to polysaccharides with lower anticoagulant activity. Therefore, GGH oxidation does not favor anticoagulant activity. Non-sulfated polysaccharides did not affect aPTT, indicating that sulfate groups are essential for anticoagulant activity.

In relation to the positive controls used, heparin and enoxaparin (low molecular weight heparin), the results correspond to those obtained in the literature, since the depolymerization process of heparin potentially damages the pentasaccharide region, causing a decrease in the potency of the anticoagulant activity (CHANDARAJOTI; LIU; PAWLINSKI, 2016). It is noteworthy that GGHS1 showed better anticoagulant potency (7.71%) than enoxaparin (6.22%).

The following tests were performed only with the samples GGHS1, GGHOPS2 and GGHOTS2, since they showed better anticoagulant activities on aPTT than GGHS2, GGHOPS1 and GGHOTS1, respectively.

The dose-response effects of the polysaccharides in PT and TT assay are showed in Fig. 5. The results confirmed that oxidation did not contribute to anticoagulant activity. Again, GGHS1 had the highest anticoagulant activity, being even more efficient than enoxaparin (by comparing the slopes of the dose-response curves). GGHOPS2 presented very low activity and GGHOTS2 did not affect PT and TT up to the highest concentration used in the test (1000 µg/mL). Therefore, GGHS1 and GGHOPS2 act by inhibiting the intrinsic, extrinsic and common pathways of the coagulation cascade, since it affects both aPTT, PT and TT, respectively.

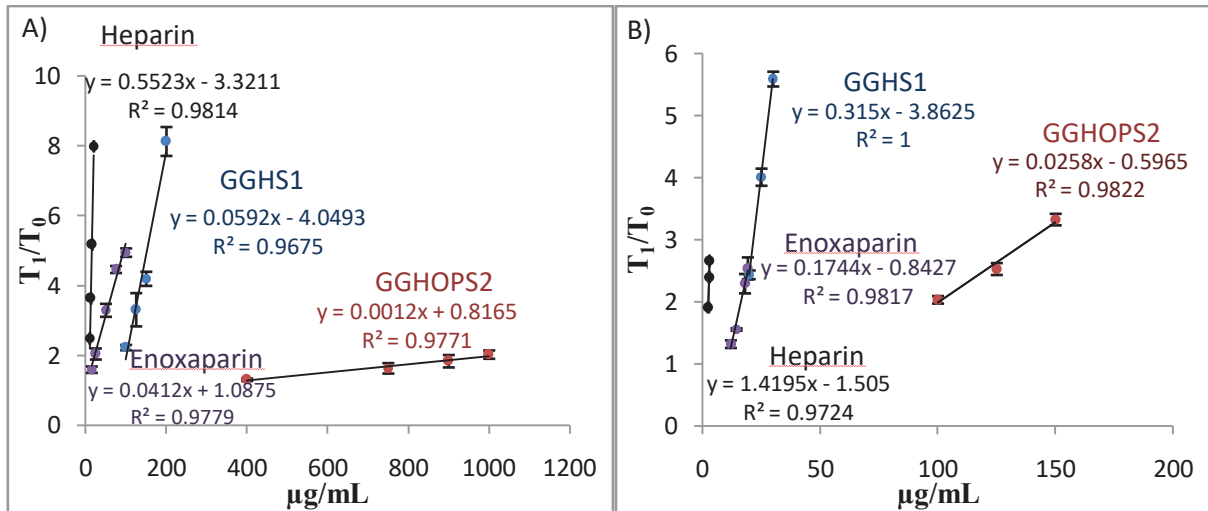


Fig. 5. Effect of the sulfated polysaccharides on PT (A) and TT (B) of citrated sheep plasma. T_0 : PT or TT (s) in the absence of polysaccharide (saline group); T_1 : PT or TT (s) in presence of polysaccharide. Results are expressed as mean \pm SEM (n=4 for PT and n=3 for TT).

The lowest anticoagulant action of the oxidized polysaccharides obtained from guar gum may be associated with their lower affinity for coagulation components and/or by nonspecific binding with other plasma proteins. To understand the mechanism of action of GGHS1, GGHOPS2 and GGHOTS2, an enzyme inhibition assay based on the mode of action of heparin was performed. The effect of GGHS1, GGHOPS2 and GGHOTS2 on the activity of the enzymes α -thrombin (FIIa) and factor Xa (FXa) was evaluated in the presence and absence of serpins (AT and HCII) (Fig. 6).

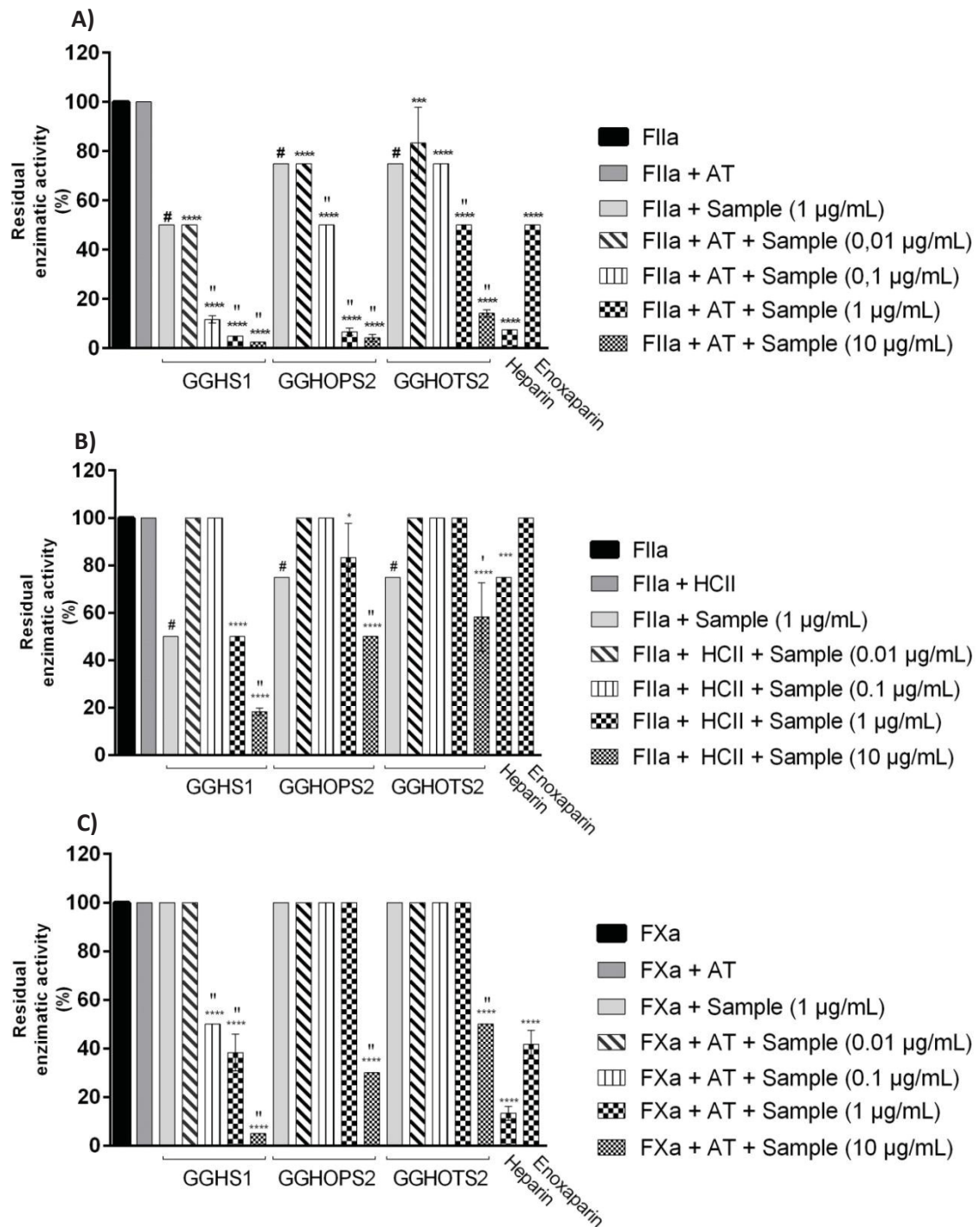


Fig. 6. Effect of GGHS1, GGHOPS2 and GGHOTS2 on FIIa (A and B) and FXa (C) activities. AT: antithrombin; HCII: heparina cofator II. Kinetic curves for FIIa and FXa were obtained through absorbance at 405 nm for 15 min. The enzymatic activities (mean \pm SEM, n = 3) were determined from the slope of the linear segment of the kinetic curves, with 100% of activity considered to be that occurring without addition of the polysaccharide and serpin. $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ **** when compared with the reaction in presence of enzyme and serpin. $p < 0.0001$ # when compared with the reaction without polysaccharide and serpin. $p < 0.05$ ’, $p < 0.0001$ ’’, when compared with the reaction with the respective polysaccharide without serpin.

FIIa activity decreased with the presence of the polysaccharides (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) without serpins (AT or HCII), which indicates a serpin-independent mode of action for these polysaccharides (Fig. 6A). Cipriani *et al.* (2009) also observed inhibitory effect on FIIa without the presence of serpins studding chemically sulfated citrus pectin. However, the presence of AT significantly potentiated the inhibitory effect of the sulfated polysaccharides on FIIa. GGHS1, GGHOPS2 and GGHOTS2 at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, without AT, decreased FIIa activity to 50%, 75% and 75%, respectively, and with AT, decreased to 5%, 6.7% and 50%, respectively. Heparin and enoxaparin at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ decreased the FIIa activity to 7.5% and 50%, respectively.

In presence of HCII, the inhibitory effect of the polysaccharides at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on FIIa was equivalent to that obtained in the absence of serpin (Fig. 6B). Thus, GGHS1, GGHOPS2 and GGHOTS2 did not inhibit FIIa via HCII. The higher inhibitory effect on FIIa observed at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of polysaccharides is probably due to the increased concentration rather than the presence of HCII. Heparin at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ decreased the FIIa activity to 75% and enoxaparin did not inhibit FIIa at the concentration tested.

GGHS1 did not inhibit FXa without the presence of AT, but in a serpin-dependent way it inhibited FXa already from 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 6C). GGHOPS2 and GGHOTS2 only inhibited FXa at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and probably the effect was dependent of AT. Heparin and enoxaparin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) decreased the FXa activity to 13.3% and 41.7%, respectively.

There was no inhibition of FIIa and FXa when incubating with serpins without the presence of sulfated polysaccharide (Fig. 6A, B and C). This result was also observed by Melo *et al.* (2004).

It is noteworthy that at the same concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, GGHS1 had a higher inhibitory effect on FIIa and a similar effect on FXa when compared to enoxaparin. It decreased the FIIa and FXa activities in an AT-dependent way to 5% and 38.3%, respectively, while enoxaparin decreased to 50% and 41.7%, respectively. Furthermore, both GGHS1 and enoxaparin were not able to inhibit FIIa via HCII. These results indicate that GGHS1 can act similarly to a low molecular weight heparin by inhibiting mainly the coagulation factors in the presence of AT and without influence of HCII. The result of GGHS1 corresponds with that shown by Barddal *et al.* (2020), with higher inhibitory effect on FIIa than FXa.

The anticoagulant activities of GGHOPS2 and GGHOTS2 were much lower than that of GGHS1 and enoxaparin (Table 4, Fig. 4 and 5). However, at least with regard to the inhibitory effect on FIIa, they also had good effects (Fig. 6). This indicates that in a more complex system, containing multiple components, as is the case of plasma in the evaluation of anticoagulant activity, the oxidized polysaccharides may be complexing with components different from those involved in the coagulation cascade, reducing their availability to exercise anticoagulant activity.

Another possibility is that GGHOPS2 and GGHOTS2 are less able to interact with any protein, including those involved in coagulation. Studies report that the presence of iduronic acid (IdopA) is directly related to the high capacity of heparin to interact with different positively charged proteins, unlike the GAGs that are made up of glucuronic acid (GlcA). IdopA residues have conformational flexibility, with internal interconversion between chair or skew-boat. This ability gives GAGs that contain IdopA a mechanism that electrostatically and energetically facilitates the accessibility of anionic groups with the protonated regions of proteins (CASU *et al.*, 1988). Noto *et al.* (2005) studied pectic chains with repetition of galacturonic acid (GalA) residues and analyzed that the charges and the presence of water contribute significantly to its rigid conformation through intramolecular hydrogen bonds and with water molecules. In view of this, the insertion of uronic acids, mainly GalA, into guar gum derivatives may have hindered their interaction with inhibitory proteins of the coagulation cascade due to the conformational rigidity they may have acquired. In fact, the most oxidized derivative (GGHOTS2), which contains a large proportion of GalA and also mannuronic acid (ManA), had the lowest anticoagulant activity (Table 4, Fig. 4 and 5) and the lowest capacity to inhibit FIIa and FXa (Fig. 6).

3.4.1 Protamine as antidote

Overdose of an anticoagulant agent causes bleeding, and having an antidote to this situation is important. Protamine is used to reverse the effects of heparin. It is a highly basic protein, displaying positive charges under physiological pH, which allows its interaction with negative groups of the heparin (CHANDARAJOTI; LIU; PAWLINSKI, 2016). In the same way as with heparin, protamine was able to reverse the effect of the sulfated polysaccharides on aPTT (Fig. 7).

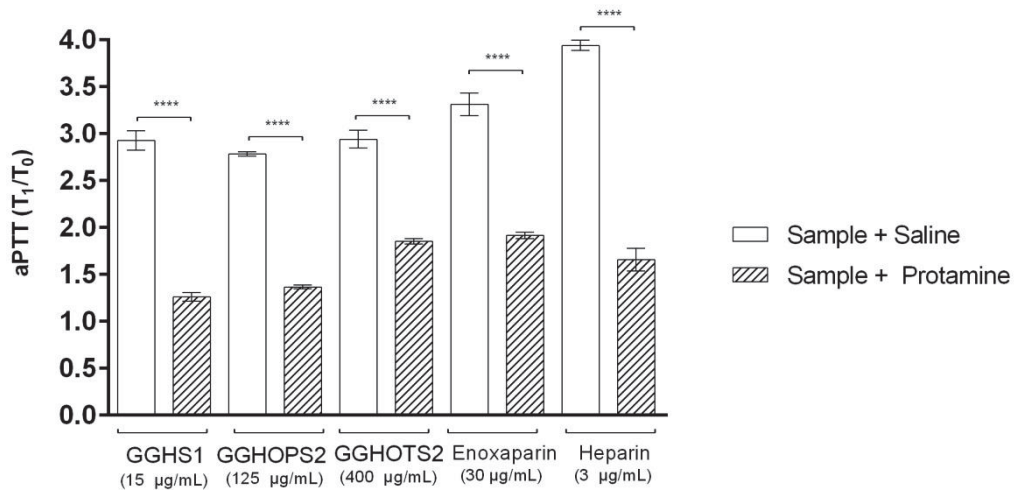


Fig. 7. Effect of protamine on the anticoagulation activity of GGHS1, GGHOPS2 and GGHOTS2. T_0 : aPTT (s) in the absence of polysaccharide and protamine (saline group); T_1 : aPTT (s) in presence of polysaccharide with or without protamine. Protamine and polysaccharides were used in equal concentrations. Results are expressed as mean \pm SEM, $n = 4$, with $p < 0.0001$ ****.

3.4.2 aPTT *ex vivo*

Low molecular weight heparins, like enoxaparin, are used via subcutaneous administration. In order to check the absorption of GGHS1, GGHOPS2 and GGHOTS2 when administered subcutaneously, *ex vivo* aPTT was performed. Initially, *ex vivo* aPTT was evaluated using a dose of 20 mg/kg, but none of the samples showed anticoagulant activity. When the dose was increased to 40 mg/kg, only GGHS1 showed a slight tendency to anticoagulant activity. In view of this, GGHS1 was also evaluated at a dose of 100 mg/kg. In this condition, it showed an anticoagulant effect in rats, increasing aPTT by 2.1 to 3.8 times compared to the saline group. Moreover, the effect of GGHS1 persisted for at least 6 h, as observed for enoxaparin (Fig. 8). However, enoxaparin showed anticoagulant effect already at the dose of 20 mg/kg.

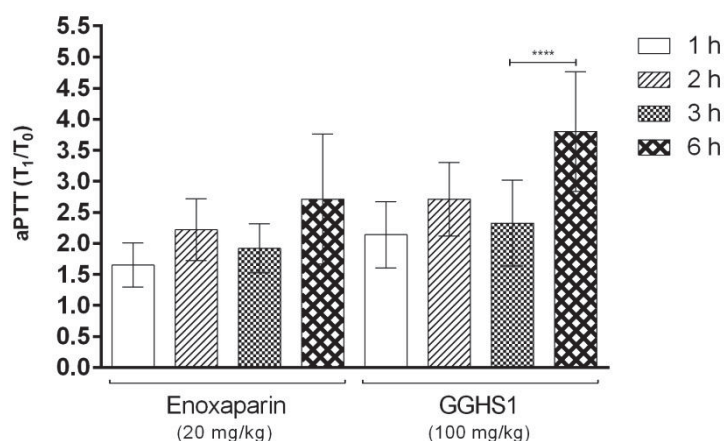


Fig. 8. *Ex vivo* aPTT after subcutaneous administration of GGHS1. T_0 : aPTT (s) in absence of polysaccharides (saline group); T_1 : aPTT (s) in presence of enoxaparin or GGHS1. aPTT of blood collected in 1, 2, 3 and 6 h after subcutaneous administration of the sample. Results are expressed as mean \pm SEM ($n=3$ animals per group, for each animal, aPTT was evaluated in quadruplicate), with $p<0.0001$ ****.

When compared to each other, the results of aPTT *ex vivo* obtained 1, 2, and 3 h after administration of GGHS1 did not show statistically significant differences. However, the anticoagulant effect after 6 h was significantly greater than the others. Barddal *et al.* (2020), evaluating a guar gum derivative similar to GGHS1, named hGGSL, with 15.6×10^3 g/mol, also obtained an *ex vivo* anticoagulant effect when administered 5 mg/kg. Thus, the results obtained here reinforce the potential of using a chemically sulfated derivative obtained from the partial acid hydrolysis of guar gum, as an anticoagulant agent for subcutaneous use, similar to what occurs for low molecular weight heparins.

4 CONCLUSIONS

In this paper was demonstrated that is possible to obtain a high yield of a low molecular weight derivative (GGH), from the partial acid hydrolysis of guar gum using 0.1 M HCl at 100 °C for 1 h. The reaction with TEMPO/TCCA was able to oxidize GGH, transforming their neutral monosaccharides in uronic acids, and changes in the amount of TCCA is able to provide structures with different degrees of oxidation. The sulfation process in the molar ratio of 18:1 of sulfation agent to free OH on the polysaccharides resulted in better DS and anticoagulant activity. In addition, transformation of the oxidized derivatives (GGHOP and GGHOT) into their triethylammonium salts before sulfation process resulted in sulfated polysaccharides with higher DS and better anticoagulant activity, even using less sulfation agent.

Analyses of anticoagulant activity showed that it is directly proportional to the DS of the studied polysaccharides, but that oxidation leads to polysaccharides with lower activity. The anticoagulant activity of the polysaccharides was mainly mediated by inhibition of FIIa in an AT-dependent way, and could be reversed by protamine. Finally, the sulfated but not oxidized derivative GGHS1, when administered subcutaneously, exerted anticoagulant action in rats for up to 6 h.

Considering the advance in the understanding of the use of guar gum to obtain an anticoagulant agent, the evaluation of its safety for use may now be the next step.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Brazilian agencies *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq grant numbers 306538/2018-0, 420986/2018-9 and 133241/2020-3) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), and the UFPR-RMN Center.

5 REFERENCES

AGARWAL, A.; DANISHEFSKY, I. Requirement of free carboxyl groups for the anticoagulant activity of heparin, *Thromb.Res.* 42 (1986) 673-680. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(86\)90345-2](https://doi.org/10.1016/0049-3848(86)90345-2).

BARDDAL, H. P. O. ; FARIA, F. A. M. ; NOGUEIRA, A. ; IACOMINI, M. ; CIPRIANI, T. R. Guar gum as an alternative to obtain a compound with anticoagulant and antithrombotic effects, *Int.J. Biol.Macromol.* 145 (2020) 604-610. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.210>.

CASU, B.; PETITOU, M; PROVASOLI, M.; SINAY, P. Conformational flexibility: a new concept for explaining binding and biological properties of iduronic acid-containing glycosaminoglycans, *Trends Biochem. Sci.* 13 (1988) 221-225. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(88\)90088-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(88)90088-6).

CHANDARAJOTI, K. ; LIU, J. ; PAWLINSKI, R. The design and synthesis of new synthetic low molecular weight heparins, *J. Thromb.Haemost.* 14 (2016) 1135-1145. <https://doi.org/10.1111/jth.13312>.

CIANCIA, M. ; QUINTANA, I. ; CEREZO, A.S. Overview of Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides from Seaweeds in Relation to their Structures, Focusing on those of Green Seaweeds, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 2503-2529. <https://doi.org/10.2174/092986710791556069>.

CIPRIANI, T. R. ; GRACHER, A. H. P. ; DE SOUZA, L. M. ; FONSECA, R. J. C. ; BELMIRO, C. L. R. ; GORIN, P. A. J. ; SASSAKI, G. L. ; IACOMINI, M. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects, *Thromb. Haemost.* 101 (2009) 860-866. <https://doi.org/10.1160/TH08-08-0556>.

CIUCANU, I.; KEREK, F.A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates, *Carbohydr.Polym.* 131 (1984) 209-217. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85242-8](https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85242-8).

CRESCENZI, V. ; DENTINI, M. ; RISICA, D. ; SPADONI, D. ; SKJAK-BRAEK, G. ; CAPITANI, D. ; MANNINA, L. ; VIEL, S.C (6)-Oxidation followed by C (5)-Epimerization of guar gum studied by high field NMR, *Biomacromolecules.* 5 (2004) 537-546. <https://doi.org/10.1021/bm034387k>

CUNHA, P. L. R. ; VIEIRA, I. G. P. ; DE PAULA, R. C. M. ; FEITOSA, J. P. A. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. Seeds as a potential guar gum substitute. *Food Hydrocoll.* 23 (2009) 880-885. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.05.005>.

DE ARAUJO, C. A. ; NOSEDA, M. D; CIPRIANI, T. R. ; GONÇALVES, A. G. ; DUARTE, M. E. R. ; DUCATTI, D. R. B. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties, *Carbohydr. Polym.* 91 (2013) 483-491. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.034>.

APA, 1995. Mixtures of particular LMW heparinic polysaccharides for the prophylaxis/treatment of acute thrombotic events. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Patent Summary for US-5389618-A. Retrieved June 17, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US-5389618-A>.

DODGSON, K. S. ; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulfate content of sulphated polysaccharides, *Biochem. J.* 84 (1962) 106-110. <https://doi.org/10.1042/bj0840106>.

DOS SANTOS, C. G. Oxidação seletiva de carragenanas utilizando o reagente TEMPO e o ácido tricloroisocianúrico como co-oxidante, *Acervo Digital UFPR* (2015). <http://hdl.handle.net/1884/48457>.

FILISSETTI-COZZI, T. M. ; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Ann. Clin. Biochem.* 197 (1991) 157-162. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90372-z](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90372-z).

HOOK, M. ; LINDAHL, U. L. F. ; IVERIUS, P. H. Distribution of Sulphate and Iduronic Acid Residues in Heparin and Heparan Sulphate. *Biochem. J.* 137 (1974) 33-43. <https://doi.org/10.1042/bj1370033>.

LARM, O. ; LARSSON, K. ; SCHOLANDER, E. The preparation of a heparin analogue from alginic acid. *Carbohydr. Res.* 73 (1979) 332-336. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)85511-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85511-1).

LI, Q. ; HE, D. ; CHEN, W. ; NI, L. Preparation, Characterization and Anticoagulant Activity of Guar Gum Sulphate. *J. Macromol. Sci. Pure. Appl. Chem.* 42 (2005) 1085-1094. <https://doi.org/10.1081/MA-200065936>.

MAAS, N. C. ; GRACHER, A. H. P. ; SASSAKI, G. L. ; GORIN, P. A. J. ; IACOMINI, M. ; CIPRIANI, T. R. Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: Influence on anticoagulant and antithrombotic effects. *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 1081-1087. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.070>.

MELO, F. R. ; PEREIRA, M. S. ; FOGUEL, D. ; MOURÃO, P. A. S. Antithrombin-mediated Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides: Different mechanisms for heparin and sulfated galactans. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20824-20835. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308688200>.

NOOY, A. E. J. ; BESEMER, A. C. ; BEKKUM, H. V. Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. *Carbohydr. Res.* 269 (1995) 89-98. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)00343-E](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)00343-E).

NOTO, R. ; MARTORANA, V. ; BULONE, D. ; SAN BIAGIO, P. L. Role of Charges and Solvent on the Conformational Properties of Poly (galacturonic acid) Chain: A Molecular Dynamics Study. *Biomacromolecules.* 6 (2005) 2555-2562. <https://doi.org/10.1021/bm050280g>.

PIERRE, G. ; PUNTA, C. ; DELATTRE, C. ; MELONE, L. ; DUBESSAY, P. ; FIORATI, A. ; PASTORI, N. ; GALANTE, Y. M. ; MICHAUD, P. TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides: An ongoing story. *Carbohydr. Polym.* 16 (2017) 71-85. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.028>.

POMIN, V. H. An overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. *Biopolymers.* 91 (2009) 601-609. <https://doi.org/10.1002/bip.21200>.

PONZINI, E. ; NATALELLO, A. ; BECHMANN, M. ; PERI, F. ; MULLER, N. ; GRANDORI, R. Structural characterization of aerogels derived from enzymatically oxidized galactomannans of

fenugreek, sesbania and guar gums, *Carbohydr. Polym.* 207 (2019) 510-520. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.100>.

PRABAHARAN, M. Prospective of guar gum and its derivatives as controlled drug delivery systems, *Int. J. Biol. Macromol.* 49 (2011) 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.04.022>.

ROMÁN OCHOA, Y. ; IACOMINI, M. ; SASSAKI, G. L. ; CIPRIANI, T. R. Different patterns in the chemical structure and their effects on anticoagulant activity, *Int. J. Biol. Macromol.* 97 (2017) 357-364. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.035>.

SANTOS-FIDENCIO, G. C. ; GONÇALVES, A. G. ; NOSEDA, M. D. ; DUARTE, E. R. ; DUCATTI, D. R. B. Effects of carboxyl group on the anticoagulant activity of oxidized carrageenans. *Carbohydr. Polym.* 214 (2019) 286-293. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.057>.

SASSAKI, G. L. ; GORIN, P. A. ; SOUZA, L. M. ; CZELUSNIAK, P. A. ; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation, *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 731-739. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.01.020>.

SASSAKI, G. L. ; GUERRINI, M. ; SERRATO, R. V. ; FILHO, A. P. A. ; CARLOTTO, J. ; SIMAS-TOSIN, F. ; CIPRIANI, T. R. ; IACOMINI, M. ; TORRIG, ; GORIN, P. A. J. Monosaccharide composition of glycans based on Q-HSQC NMR. *Carbohydr. Polym.* 104 (2014) 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.046>.

SAKAKIBARA, C. N. ; SIERAKOWSKI, M. R. ; LUCYSZYN, N. ; DE FREITAS, R. A. TEMPO mediated oxidation on galactomannan: Gal/Man ratio and chain flexibility dependence, *Carbohydr. Polym.* 153 (2016) 371-378. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.114>.

THOMBARE, N. ; JHA, U. ; MISHRA, S. ; SIDDIQUI, M. Z. Guar gum as a promising starting material of diverse applications: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 88 (2016) 361-372. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.001>.

WESSEL, P. H. ; HOSANG, M. ; TSCHOPP, T. B. ; WEIMANN, B. J. Heparin, carboxyl-reduced sulfated heparin, and Trestatin A sulfate. Antiproliferative and anticoagulant activities, *Carbohydr. Res.* 204 (1990) 131-139. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(90\)84028-s](https://doi.org/10.1016/0008-6215(90)84028-s).

WHISTLER, R. L. ; KOSIK, M. Anticoagulant Activity of Oxidized and N- and O- sulfated Chitosan. *Arch. Biochem. Biophys.* 142 (1971) 106-110. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(71\)90264-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(71)90264-5).

WHISTLER, R. L. ; SPENCER, W. W. Sulfation, in: R. L. Whistler, R. J. Smith, J. N. BeMiller, M. L. Wolfrom (Eds.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Academic press, New Tor/London, 1964, pp. 297-298.

YANG, J. ; DU, Y. ; HUANG, R. ; WAN, Y. ; WEN, Y. The structure-anticoagulant activity relationships of sulfated lacquer polysaccharide: Effect of carboxyl group and position of sulfation, *Int. J. Biol. Macromol.* 36 (2005) 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.03.002>.

ZOLFIGOL, M. ; SHIRINI, M. ; CHOGHAMARANI, A. G. Trichloroisocyanuric Acid/KBr as a Catalytic System for the Chemoselective Oxidation of Benzylic and Secondary Alcohols, *ChemInform.* 37 (2006) 2043-2046. <https://doi.org/10.1055/s-2006-942396>.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foi demonstrado que é possível obter um alto rendimento de um derivado de baixo peso molecular (GGH), a partir da hidrólise ácida parcial da goma guar utilizando HCl 0,1 M a 100 °C durante 1 h. A reação com TEMPO/TCCA foi capaz de oxidar o GGH, transformando seus monossacarídeos neutros em ácidos urônicos, e as mudanças na quantidade de TCCA é capaz de fornecer estruturas com diferentes graus de oxidação. O processo de sulfatação na razão molar de 18:1 do agente sulfatante para OH livre dos polissacarídeos resultou em melhor DS e atividade anticoagulante, quando o polissacarídeo a ser sulfatado era solúvel em DMF. Além disso, a transformação em sais de trietilamônio permitiu uma melhor solubilidade em DMF aos derivados oxidados (GGHOP e GGHOT), resultando em polissacarídeos sulfatados com DS mais alto e melhor atividade anticoagulante, mesmo usando menos agente sulfatante.

As análises da atividade anticoagulante mostraram que é diretamente proporcional ao DS dos polissacarídeos estudados, mas que a oxidação leva a polissacarídeos com menor atividade. A atividade anticoagulante dos polissacarídeos foi mediada principalmente pela inibição do FIIa de forma dependente de AT, e pôde ser revertida pela protamina. Finalmente, o derivado sulfatado, mas não oxidado, GGHS1, quando administrado por via subcutânea, exerceu ação anticoagulante em ratos por até 6 h.

Considerando o avanço no entendimento do uso da goma guar para a obtenção de um agente anticoagulante, a avaliação de sua segurança de uso e toxicidade podem agora ser os próximos passos.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, R. L. C.; BIRD, R. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology**, v.14, p. 462-470, 2009.

ADRIEN, A.; BONNET, A.; DUFOUR, D.; BAUDOUIN, S.; MAUGARD, T.; BRIDIAU, N. Anticoagulant activity of sulfates ulvan isolated from the green macroalga *Ulva rigida*. **Marine drugs**. v. 17, p. 1-19. 2019.

AGARWAL, A.; DANISHEFSKY, I. Requirement of free carboxyl groups for the anticoagulant activity of heparin. **Thrombosis Research**. v. 42, p. 673-680. 1986.

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

APA, 1995. Mixtures of particular LMW heparinic polysaccharides for the prophylaxis/treatment of acute thrombotic events. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Patent Summary for US-5389618-A. Retrieved June 17, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US-5389618-A>.

AUSTIN, K. S. Haemostasis. **Medicine**, v. 45, n. 4, p. 204-208, 2017.

ASLANI, S.; KABIRI, M.; HOSSEINZADECH, S.; HANAEE-AHVAVZ, H.; TAHERZADEH, E. S.; SOLEIMANI, M. The applications of heparin in vascular tissue engineering. **Microvascular Research**. v. 131, p. 1-14. 2020.

BARDDAL, H. P. O.; FARIA, F.A.M; NOGUEIRA, A.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T.R. Guar gum as an alternative to obtain a compound with anticoagulant and antithrombotic effects. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 145, p. 604-610. 2020.

CAPUTO, H. E.; STRAUB, J. E.; GRINSTAFF, M. W. Design, synthesis, and biomedical applications of synthetic sulphated polysaccharides. **Chemical Society Reviews**. v. 48, p. 2338-2365. 2019.

CARLOS, M. M. L.; FREITAS, P. D. F. S. Estudo da cascata de coagulação sanguínea e seus valores de referência. **Acta Veterinária Brasileira**. v. 1, n. 2, p. 49-55. 2007.

CASU, B. Structure and Active Domains of Heparin. In: Garg, H. G.; Linhardt, R. J.; Hales C. A. Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate. Chapter 1. Elsevier, p.1-28. 2005.

CHAGAS, F. D. S.; LIMA, G. C.; DOS SANTOS, V. I. N.; COSTA, L. E. C.; DE SOUSA, W. M.; SOMBRA, V. G.; DE ARAUJO, D. F.; BARROS, F. C. N.; MARINHO-SORIANO, E.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M.; PEREIRA, M. G.; FREITAS, A. L. P. Sulfated polysaccharide from red algae *Gelidiella acerosa*: anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 159, p. 415-421. 2020.

CHANDARAJOTI, K.; LIU, J.; PAWLINSKI, R. The design and synthesis of new synthetic low molecular weight heparins. *Journal of Thrombosis Haemostasis*. v. 14, p. 1135-1145. 2016.

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; CEREZO, A. S. Overview of Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides from Seaweeds in Relation to their Structures, Focusing on those of Green Seaweeds. **Current Medicinal Chemistry**. v.17, p. 2503 - 2529. 2010.

CURNOW, J.; PASALIC, L.; FAVALORO, E. J. Why do patients bleed? **Journal of Surgery**. v. 2, p. 29-43. 2016.

CLÉ, D. V.; GARCIA, A. A.; BRUNETTA, D. M.; SCHWARTZMANN, P.; MORIGUTI, J. G. Anticoagulação em pacientes hospitalizados. Simpósio: Condutas em enfermagem de clínica média de hospital de média complexidade- parte 1 Capítulo II. *Medicina (Ribeirão Preto)*. P. 107-117. 2010.

CRESCENZI, V.; DENTINI, M.; RISICA, D.; SPADONI, D.; SKJAK-BRAEK, G.; CAPITANI, D.; MANNINA, L.; VIEL, S. C (6)-Oxidation followed by C (5)-Epimerization of guar gum studied by high field NMR. **Biomacromolecules**. v. 5. P. 537-546, 2004.

DE CARVALHO, M. M.; DE FREITAS; R. A.; DUCATTI, D. R. B.; FERREIRA, L. G.; GONÇALVES, F. G.; COLODI, F. G.; MAZEPA, E.; ARANHA, E. M.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R. Modification on fulvans via periodate-chlorite oxidation: chemical characterization and anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**. v. 197, p. 631-640. 2018.

DE SOUZA, C. F.; LUCYSZYN, N.; FERRAZ, F. A.; SIERABOSKI, M. R. Oxidation and N-alkylation at the C-6 position of galactomannan extracted from *Caesalpinia ferreavar.ferrea* seeds. **Macromolecular Symposia**. v. 299/300, p. 66-73. 2011.

DING, B.; YE, Y. Q.; CHENG, J.; WANG, K.; LUO, J.; JIANG, B. TEMPO-mediated selective oxidation of substituted polysaccharides – an efficient approach for the determination of the degree of substitution at C-6. **Carbohydrate Research**. v.343, p. 3112-3116. 2008.

DOS SANTOS, G. C. **Oxidação seletiva de carragenanas utilizando o reagente TEMPO e o ácido tricloroisocianúrico como co-oxidante**. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P. M. Past, present and future of hemophilia: a narrative review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, p. 7-24. 2012.

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

GEORGE, A.; SHAH, P. A.; SHRIVASTAV, P. S. Guar gum: Versatile natural polymer for drug delivery applications. **European Polymer Journal**. v. 112, p. 722-735. 2019.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: A Modern View of Hemostasis. **Hematology Oncology Clinics of North America**. v. 21, p. 1-11. 2007.

HOOK, M.; LINDAHL, U.L.F.; IVERIUS, P. H. Distribution of Sulphate and Iduronic Acid Residues in Heparin and HeparanSulphate. **Biochemistry Journal**. v. 137, p.33-43.1974.

IVASCU, N. S.; FITZGERALD, M.; GHADIMI, K.; PATEL, P.; EVANS, A. S.; GOEDDEL, L. A.; SHAEFI, S.; KLICK, J.; JOHNSON, A.; RAITEN, J.; HORAK, J.; GUTSCHE, J. Heparin-Induced Thrombocytopenia: A Review for Cardiac Anesthesiologists and Intensivists. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**. v. 33, p. 511-520. 2019.

LI, Q.; HE, D.; CHEN, W.; NI, L. Preparation, Characterization and Anticoagulant Activity of Guar Gum Sulphate. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**. v.42. p. 1085-1094. 2005.

LIANG, L.; AO, L.; MA, T.; NI, Y.; LIAO, X.; HU, X.; SONG, Y. Sulfated modification and anticoagulant activity of pumpkin (*Cucurbita pepo*, Lady Godiva) polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 106, p. 447-455. 2018.

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

LUCA, L.; GIACOMELLI, G.; MASALA, S.; PORCHEDDU, A.; CHIMICA, D. Trichloroisocyanuric / TEMPO oxidation of alcohols under mild conditions: a close investigation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 13, p. 4999–5001, 2003.

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

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

MACKMAN, N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 122, p. 2331-2336. 2012.

MERLINI, L.; BOCCIA, A. C.; MENDICHI, R.; GALANTE, Y. M. Enzymatic and chemical oxidation of polygalactomannans from the seeds of a few species of leguminous plants and characterization of the oxidized products. **Journal of Biotechnology**. v. 198, p. 31-43. 2015.

MESTTECHKINA, N. M.; SCHERBUKHIN, V. D. Sulfated Polysaccharides and Their Anticoagulant Activity: A Review. **Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 267-273, 2010.

MOURÃO, P.A.S. Perspective on the Use of Sulfated Polysaccharides from Marine Organisms as a Source of New Antithrombotic Drug. **Marine Drugs**.v.13, p.2770-2784. 2015.

MULLOY, B.; HOGWOOD, J.; GRAY, E.; LEVER, R.; PAGE, C. P. Pharmacology of Heparin and Related Drugs. **Pharmacological Reviews**. v. 68, p. 76-141. 2016.

NOOY, A. E. J.; BESEMER, A. C.; BEKKUM, H. V. Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. **Carbohydrate Research**. v. 269, p. 89-98. 1995.

NORRIS, L. A. Blood coagulation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 17, n. 3, p 369-383. 2003.

OCHOA, Y. R. **Atividades anticoagulante e antitrombótica de polissacarídeos sulfatados e fosforilados**. 187 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

ODUAH, E. I.; LINHARDT, R. J.; SHARFSTEIN, S. T. Heparin: past, present, and future. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 38, p. 1-12. 2016.

OLIVEIRA, R. C. R; ALMEIDA, R. R.; GONÇALVES, T. A. A Review of Plant Sulfated Polysaccharides and their Relations with Anticoagulant Activities. **Journal of Developing Drugs**. v.5:166, p.1-3. 2016.

PALTA, S.; SAROA, R.; PALTA, A. Overview of the coagulation system. **Indian Journal of Anaesthesia**. v. 58, p. 515-523. 2014.

PIERRE, G.; PUNTA, C.; DELATTRE, C.; MELONE, L.; DUBESSAY, P.; FIORATI, A.; PASTORI, N.; GALANTE, Y. M.; MICHAUD, P. TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides: An ongoing story. **Carbohydrate Polymers**. v. 16, p. 71-85. 2017.

POMIN, V. H. An overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. **Biopolymers**. v. 91, n. 8, p. 601-609. 2009.

PONEDEL'KINA, I. Y.; KHAIBRAKHMANOVA, E. A.; ODINOKOV, V. N. Nitroxide-catalyzed selective oxidation of alcohols and polysaccharides. **Russian Chemical Reviews**, v. 63, p. 63–75, 2010.

PRABAHARAN, M. Prospective of guar gum and its derivatives as controlled drug delivery systems. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 49, p. 117-124. 2011.

RAU, J. C.; BEAULIEU, L. M.; HUNTINGTON, J. A.; CHURCH, F. C. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v. 5, p. 102-115. 2007.

RUTTMANN, T. Coagulation for the clinician. **South African Journal of Surgery**, v. 44, n. 1, p. 22-37, 2006.

SANTOS-FIDENCIO, G. C.; GONÇALVES, A. G.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, E. R.; DUCATTI, D. R. B. Effects of carboxyl group on the anticoagulant activity of oxidized carrageenans. **Carbohydrate polymers**. v. 214, p. 286-293. 2019.

SAKAKIBARA, C. N.; SIERAKOWSKI, M. R.; LUCYSZYN, N.; DE FREITAS; R. A. TEMPOmediated oxidation on galactomannan: Gal/Man ratio and chain flexibility dependence. **Carbohydrate polymers**. v. 153. p. 371378. 2016.

TILSTAM, U.; WEINMANN, H. Trichloroisocyanuric acid: a safe and efficient oxidant. **Organic Process Research & Development**, v. 6, p. 384–393, 2002.

THOMAS, S.; MAKRIS, M. The reversal of anticoagulation in clinical practice. **Clinical Medicine**. v. 18, p. 314-319. 2018.

THOMBARE, N.; JHA, U.; MISRHA, S.; SIDDIQUI, M. Z. Guar gum as a promising starting material of diverse applicatios: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**.n.88. 2016.

VERSTEEG, H.H.; HEEMSKERK, J. W. M.; LEVI, M.; RETISMA, P. H. New Fundamentals in hemostasia. **Physiological Reviews**, v.1, n. 93, p. 327-358, 2013.

WANG, J.; YANG, W.; WANG, J.; WANG, X.; WU, F.; YAO, J.; ZHANG, J.; LEI, Z. Regioselective sulfation of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharide: Characterization of chemical structure. **Carbohydrate Polymers**. v. 133, p. 320-327. 2015.

WANG, Z.; XIE, J.; SHEN, M.; NIE, S.; XIE, M. Sulfated modification of polysaccharides: synthesis, characterization and bioactivities. **Trends in Food Science and Technology**. v. 74, p. 147-157. 2018.

WESSEL, H. P.; HOSANG, M.; TSCHOPP, T. B.; WEIMANN, B.J. Heparin, carboxyl-reduced sulfated heparina, and Trestatin A sulfate. Antiproliferative and anticoagulant activities. **Carbohydrate Research**. v. 204, p. 131-139. 1990.

WHISTLER, R. L.; KOSIK, M. Anticoagulant Activity of Oxidized and N- and O- sulfated Chitosan. **Archives of Biochemistry and Biophysic**.v.142. p. 106-110. 1971.

ZOLFIGOL, M.; SHIRINI, M.; CHOGHAMARANI, A. G. Trichloroisocyanuric Acid/KBr as a Catalytic System for the Chemoselective Oxidation of Benzylic and Secondary Alcohols. **ChemInform**. n. 12, p. 2043-2046. 2006.

ANEXO 1 – CEUA 1369

09/10/2020

SEI/UFPR - 2951843 - CEUA/BIO: Certificado



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1369

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.044508/2020-01

APROVADO/APPROVAL: 15/09/2020 – R.O. 06/2020

TÍTULO: Atividade anticoagulante da goma guar parcialmente hidrolisada, carboxilada e quimicamente sulfatada.

TITLE: Anticoagulant activity of guar gum partially hidrolized, carboxylated and chemically sulfated.

AUTORES/AUTHORS: Thales Ricardo Cipriani, Franciê Assis Melo Faria.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Bioquímica e Biologia Molecular

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, Institucional**, em 29/09/2020, às 23:38, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **2951843** e o código CRC **EC3F3D7D**.