

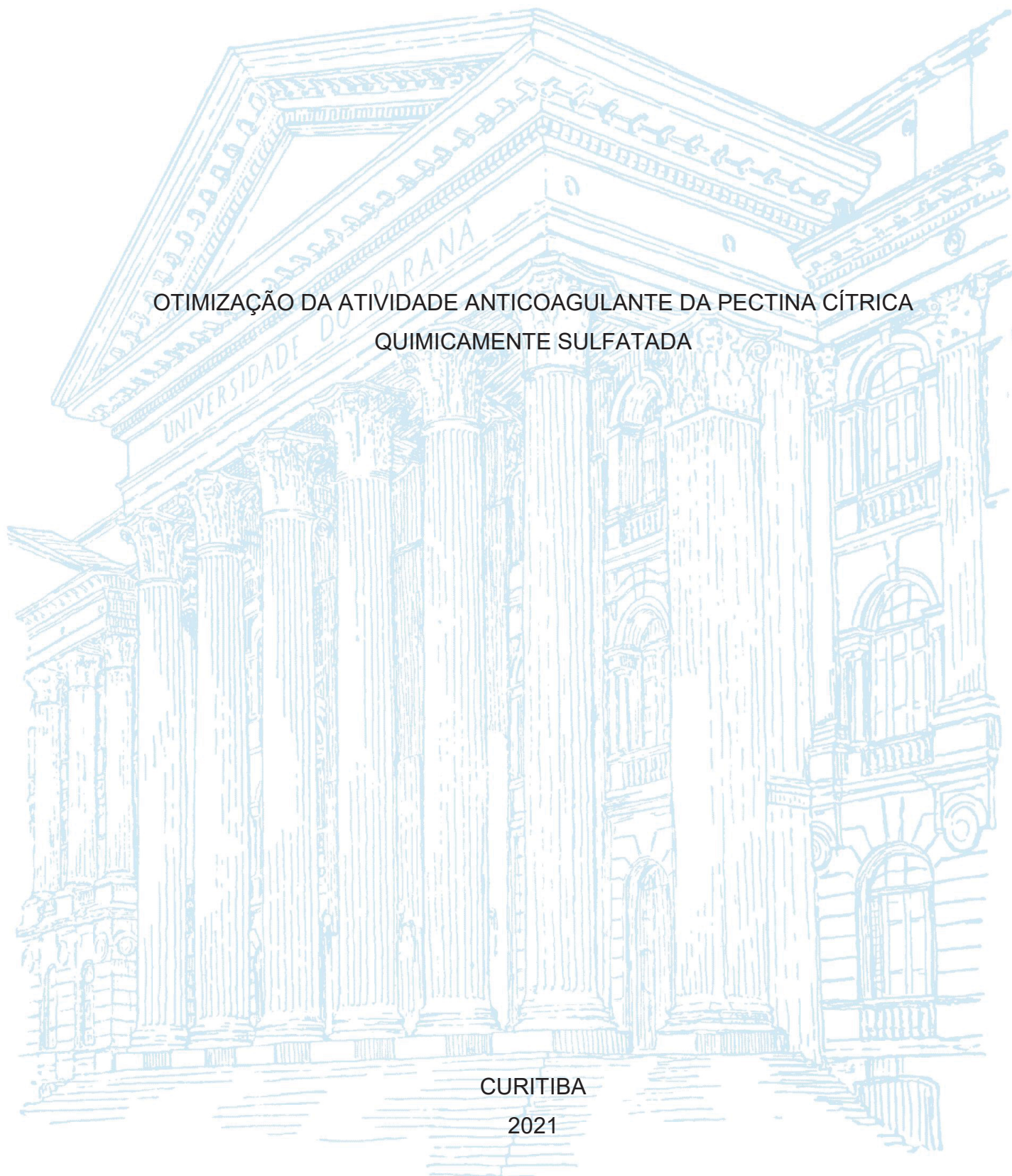
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARINA BOARON

OTIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DA PECTINA CÍTRICA
QUIMICAMENTE SULFATADA

CURITIBA

2021



CARINA BOARON

OTIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DA PECTINA CÍTRICA
QUIMICAMENTE SULFATADA

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

Orientador: Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Boaron, Carina

Otimização da atividade anticoagulante da pectina cítrica quimicamente sulfatada. / Carina Boaron. – Curitiba, 2021.

95 p.: il.

Orientador: Thales Ricardo Cipriani.

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

1. Pectinas. 2. Polissacarídeos. 3. Anticoagulantes. 4. Estrutura química. I. Título. II. Cipriani, Thales Ricardo, 1978. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

CDD (22. ed.) 572.566



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 **CARINA BOARON** intitulada: **Otimização da atividade anticoagulante da pectina cítrica 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 mestra 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, 22 de Setembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

28/09/2021 13:54:51.0

THALES RICARDO CIPRIANI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

28/09/2021 13:46:28.0

FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR)

Assinatura Eletrônica

28/09/2021 13:33:46.0

DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico essa dissertação à minha mãe, Matilde, que sempre esteve ao meu lado me incentivando e apoiando. E a minha vó Cristina, que sempre apoiou minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela oportunidade de ter vivenciado o mestrado. Em seguida, agradeço aos meus pais, Marcio e Matilde, minha irmã Caroline e minha sobrinha, Isabelle, pelo apoio e carinho. Sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui, muito obrigada! Vó Cristina, 2020 realmente foi muito difícil, eu ainda não processei sua perda, mas sinto sua presença todos os dias, espero que você sinta muito orgulho da sua neta.

Agradeço a turminha da carboidratos dos laboratórios 252, 250, 247 e E1, foi maravilhoso ter tido a oportunidade de compartilhar esse tempo com vocês, compartilhando além do conhecimento, muita risada, inseguranças, preocupações, apoio, ajuda e a vontade de fazer ciência.

Agradeço em especial a minha amiga Franciê Assis, a Fran, que está comigo nessa caminhada da vida desde 2010, fico muito feliz de ter realizado o mestrado com você, obrigada por todo o apoio e ajuda, você foi essencial. Espero que possamos compartilhar mais fases da vida juntas!

Agradeço ao meu professor e orientador Thales, pela paciência, pelo conhecimento, pela orientação e dedicação à mim e ao trabalho. Muito obrigada professor, você é um exemplo para mim, espero ser uma excelente profissional, como o senhor é.

Por fim agradeço aos demais amigos e familiares que sempre me incentivaram e me apoiaram, principalmente em momentos de incertezas e de dificuldades a gente vê a força que é ter alguém do lado.

O ano de 2020 e 2021, devido à pandemia do COVID-19, foi de grande dificuldade para o mundo em geral, isso afetou a rotina das atividades e de pesquisa, mas fico extremamente feliz por ter conseguido realizar as atividades e ter finalizado a pesquisa no meio de tanta incerteza.

E por fim, agradeço à Universidade Federal do Paraná, ao Centro de RMN-UFPR e às agências de fomento (CAPES e CNPq) que permitiram e contribuíram para o desenvolvimento das atividades do meu projeto.

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, conclusão e referências. O artigo científico inclui revisão bibliográfica, materiais e métodos, resultados e discussões, e referências.

RESUMO

A modificação da estrutura química de polissacarídeos naturais, pode proporcionar uma melhoria de sua atividade biológica. Neste sentido, a sulfatação química de polissacarídeos tem ganhado notoriedade, principalmente no que concerne à atividade anticoagulante, como exemplo, a pectina cítrica (PC) sulfatada, que possui potencial para ser usada para este fim. Esta pesquisa visa, então, otimizar a sulfatação química, assim como, realizar ciclos de carboxirredução na PC, a fim de compreender sua estrutura-atividade e obter uma molécula com um melhor desempenho anticoagulante. Neste estudo, a PC, foi submetida à diálise e hidrólise ácida parcial, para a obtenção da PC de alta e baixa massa molecular, respectivamente (PCAM = 298,8 kg/mol e PCBM = 7,53 kg/mol). Visando produtos que apresentem melhores atividades anticoagulantes, elas foram submetidas a otimização da sulfatação química, variando-se a relação molar de agente sulfatante por grupo hidroxila no polissacarídeo ($\eta\text{SO}_3\text{-piridina/OH}$), o tempo de reação (h) e o volume total da reação por massa de amostra (Vt/m). A atividade anticoagulante foi avaliada pela capacidade dos derivados em aumentarem o aPTT. Os derivados sulfatados de alta e baixa massa com melhor atividade, PCAMS1 (DS = 1,41) e PCBMS1 (DS = 0,52), foram obtidos com $\eta\text{SO}_3\text{-piridina/OH}$ = 9, 8 h e 4 h de reação, respectivamente, e Vt/m = 100 mL/g. A melhor solubilidade de PCAM durante a reação de sulfatação parece ter contribuído para um maior DS, em comparação com PCBM. PCAMS1 e PCBMS1 foram carboxirreduzidos (1 e 4 ciclos; CR1 e CR4) e também submetidos a um segundo ciclo de sulfatação (S2). Verificou-se que os grupos carboxílicos influenciam a atividade anticoagulante, já que os derivados carboxirreduzidos apresentaram menores atividades, associado ao fato também de que a reação de carboxirredução levou à retirada de grupamentos sulfatos da estrutura. Além disso, é possível que a interação do grupo sulfato com as proteínas da cascata da coagulação seja mais efetiva do que a interação dos grupos carboxílicos, uma vez que as amostras resulfatadas (S2) apresentaram melhores propriedades anticoagulantes. Ao final, os derivados com as melhores atividades anticoagulantes foram PCAMS2CR4 (aPTT em 40 $\mu\text{g/mL}$ = 226,2 s; DS = 1,27) e PCBMS2CR1 (aPTT em 50 $\mu\text{g/mL}$ = 187,1 s; DS = 1,30), que demonstraram atuar inibindo FIIa e FXa sem a presença de serpinas, mas com o efeito sendo aumentado na presença de antitrombina, especialmente sobre FIIa. A otimização da sulfatação química e as outras alterações efetuadas na PCAM e PCBM mostraram exercer influência sobre a atividade anticoagulante, possibilitando compreender melhor a relação estrutura-atividade destes derivados de PC.

Palavras-chave: Pectina cítrica. Otimização da sulfatação química. Carboxirredução. Otimização da atividade anticoagulante.

ABSTRACT

The modification of the chemical structure of natural polysaccharides can provide an improvement in their biological activity. Thus, the chemical sulfation of polysaccharides has gained notoriety, especially with regard to anticoagulant activity, as example, sulfated citrus pectin (CP), has the potential to be used for this purpose. Therefore, this research aims to optimize chemical sulfation, as well as performing carboxyl-reduction cycles in CP, in order to understand its structure-activity and obtain a molecule with better anticoagulant performance. In this study, CP was submitted to dialysis and partial acid hydrolysis to obtain high and low molecular weight CP, respectively (CPHW = 298.8 kg/mol and CPLW = 7.53 kg/mol). Aiming at products that present better anticoagulant activities, they were subjected to optimization of chemical sulfation, varying the molar ratio of sulfating agent per hydroxyl group in the polysaccharide ($\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH}$), the reaction time (h) and the total volume of the reaction per sample weight (Vt/w). The anticoagulant activity was evaluated by the ability of derivatives to increase aPTT. The high and low weight sulfated derivatives with better activity, CPHWS1 (DS = 1.41) and CPLWS1 (DS = 0.52), were obtained with $\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH}$ = 9, 8 h and 4 h of reaction, respectively, and Vt/w = 100 mL/g. The better solubility of CPHW during the sulfation reaction seems to have contributed to a higher DS compared to CPLW. CPHWS1 and CPLWS1 were carboxyl-reduced (1 and 4 cycles; CR1 and CR4) and also subjected to a second sulfation cycle (S2). It was verified that the carboxyl groups influence the anticoagulant activity, since the carboxyl-reduced derivatives had lower activities, also associated with the fact that the carboxyl-reduction reaction led to the removal of sulfate groups from the structure. Furthermore, it is possible that the interaction of the sulfate group with the coagulation cascade proteins is more effective than the interaction of carboxylic groups, since the resulfated samples (S2) had better anticoagulant properties. In the end, the derivatives with the best anticoagulant activities were CPHWS2CR4 (aPTT at 40 $\mu\text{g/mL}$ = 226.2 s; DS = 1.27) and CPLWS2CR1 (aPTT at 50 $\mu\text{g/mL}$ = 187.1 s; DS = 1.30), which showed to act inhibiting FIIa and FXa without the presence of serpins, but with the effect being increased in the presence of antithrombin, especially on FIIa. The optimization of chemical sulfation and other changes made in the CPHW and CPLW have shown to influence the anticoagulant activity, enabling a better understanding of the structure-activity relationship of these CP derivatives.

Keywords: Citrus pectin. Optimization of chemical sulfation. Carboxyl-reduction. Optimization of anticoagulant activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MODELO VIA EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA DA CASCATA DE COAGULAÇÃO.	20
FIGURA 2 – PONTO DE INÍCIO DOS TESTES DE COAGULAÇÃO <i>IN VITRO</i>	24
FIGURA 3 – LOCAIS DE AÇÃO DE ANTICOGULANTES COMERCIAIS NA CASCATA DE COAGULAÇÃO.	29
FIGURA 4 – ESTRUTURA DA HEPARINA: PRINCIPAIS UNIDADES DE REPETIÇÃO DE DISSACARÍDEOS TRISSULFATADOS PRESENTES EM SUA ESTRUTURA	31
FIGURA 5 – MECANISMO DE AÇÃO DA HEPARINA NA ATIVAÇÃO DA ANTITROMBINA.	33
FIGURA 6 – INTERAÇÃO ENTRE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS DE AT COM A HEPARINA ^{1,2}	34
FIGURA 7 – SULFATAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS	42
FIGURA 8 – ESTRUTURA QUÍMICA DA HOMOGALACTURONANA NÃO METILESTERIFICADA	47
FIGURA 9 – ESTRUTURAS DE RG-I (a) E RG-II (b) ENCONTRADAS EM PECTINAS..	47

LISTA DE FIGURAS ARTIGO

Figure 1. HPSEC elution profiles of derivatives of CPHW (a) and CPLW (b).	65
Figure 2. ^1H - ^{13}C -HSQC analyses of CPHW (a) and CPLW (b).	66
Figure 3. Optimization of chemical sulfation of CPHW monitored via anticoagulant activity determined by aPTT analysis of citrated human plasma a) Evaluation of ηSO_3 -pyridine/OH of 6, 9, 12 and 18, reaction time = 6 h and Vt/w = 100 mL/g, at 50 °C; b) Evaluation of reaction time of 6, 8 and 10 h, ηSO_3 -pyridine/OH = 9 and Vt/w = 100 mL/g, at 50 °C; c) Evaluation of Vt/w of 100 and 50 mL/g, ηSO_3 -pyridine/OH = 9 and reaction time = 8 h, at 50 °C. Results expressed as mean \pm SD (n = 4).	69
Figure 4. Effect curve of derivatives of CPHW (a) and CPLW (b) on aPTT of citrated human plasma. T_0 = aPTT in the absence of polysaccharide (negative control = saline); T_1 = aPTT in the presence of polysaccharide. Results expressed as mean \pm SD (n = 4).	73
Figure 5. HSQC analyses of CPHWS1 (red) and CPHW (black) (a), and CPLWS1 (red) and CPLW (black) (b).	74
Figure 6. Effect of CPHWS1 and CPLWS1, after 6 months stocked, on aPTT of citrated human plasma. Samples were tested at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (final concentration, considering the volumes of plasma + sample). Results are expressed as mean \pm SD (n = 4).	75
Figure 7. ^1H - ^{13}C -HSQC-edited analysis of CPHWS1CR1 (black and green) and CPHWS1CR4 (red and pink).	76
Figure 8. ^1H - ^{13}C -HSQC-edited analysis of CPLWS1CR1 (black and green) and CPLWS1CR4 (red and pink).	77
Figure 9. ^1H - ^{13}C -HSQC-edited analysis of CPHWS2CR4.	79
Figure 10. ^1H - ^{13}C -HSQC-edited analysis of CPLWS2CR1.	80
Figure 11. Effect of CPHWS2CR4 on FIIa+AT (a), FIIa+HCII (b) and FXa+AT (c) activities. CPHWS2CR4 is named by A; FIIa (α -thrombin); FXa (Factor Xa); AT (antithrombin); HCII (heparin cofactor II). Results are expressed as mean \pm SD, n = 3, with 100% of activity considered to be that occurring without addition of polysaccharide and serpin. $p < 0.05^*$, 0.01^{**} and 0.001^{***} , when compared with the reaction without polysaccharide and serpin.	81
Figure 12. Effect of CPLWS2CR1 on FIIa+AT (a), FIIa+HCII (b) and FXa+AT (c) activities. CPLWS2CR1 is named by B; FIIa (α -thrombin); FXa (Factor Xa); AT (antithrombin); HCII (heparin cofactor II). Results are expressed as mean \pm SD, n = 3,	

with 100% of activity considered to be that occurring without addition of polysaccharide and serpin. $p < 0.05^*$, 0.01^{**} and 0.001^{***} , when compared with the reaction without the polysaccharide and serpin. 81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE SULFATAÇÃO MAIS COMUNS.....	42
---	----

LISTA DE TABELAS ARTIGO

Table 1. Monosaccharide composition of CPHW and CPLW.	65
Table 2. ^1H - ^{13}C -HSQC chemical shifts of CPHW and CPLW expressed as δ (ppm).....	66
Table 3. Optimization of chemical sulfation of CPHW monitored via anticoagulant activity determined by aPTT analysis of citrated human plasma.	68
Table 4. Optimization of chemical sulfation of CPLW monitored via anticoagulant activity determined by aPTT analysis of citrated human plasma.	70

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

aPTT → Tempo de tromboplastina parcial ativada

AT → Antitrombina III

CID → Coagulação intravascular disseminada

CTA → Coagulopatia traumática aguda

DS → Dosagem de sulfato

η SO₃-piridina/OH → relação molar de agente sulfatante por grupo hidroxila no polissacarídeo

FT → Fator tecidual

GAG → Glicosaminoglicanos

GalA → Ácido galacturônico

HBMM → Heparina de baixa massa molecular

HCII → Cofator II da heparina

HG → Homogalacturonana

HMMU → Heparina de massa molecular ultrabaixa

HMWK → Cininogênio de alta massa molecular

HNF → Heparina não fracionada

PT → Tempo de protrombina

RG-I → Ramnogalacturonana do tipo I

RG-II → Ramnogalacturonana do tipo II

TFPI → Inibidor da via do fator tecidual

t-PA → Ativador de plasminogênio tecidual

TT → Tempo de trombina

Vt/m → volume total da reação por massa de amostra

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 HEMOSTASIA	18
2.2 CASCATA DE COAGULAÇÃO.....	19
2.2.1 Avaliação da coagulação <i>in vitro</i>	23
2.2.2 Distúrbios na coagulação	26
2.3 ANTICOAGULANTES	28
2.4 HEPARINA	31
2.5 POLISSACARÍDEOS NATURALMENTE OU QUIMICAMENTE SULFATADOS COM ATIVIDADE ANTICOAGULANTE	37
2.5.1 Métodos de sulfatação química em polissacarídeos	41
2.5.2 Otimização da sulfatação química de polissacarídeos	44
2.6 PECTINA CÍTRICA	46
3 JUSTIFICATIVA	53
4 OBJETIVOS	54
4.1 OBJETIVOS GERAL.....	54
4.1.1 Objetivos específicos.....	54
ARTIGO	55
5 CONCLUSÃO	88
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	88
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são polímeros naturais, que podem ser extraídos, por exemplo, das plantas, fungos, bactérias e animais (WANG *et al.*, 2018; CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009). Muitas vezes, os polissacarídeos naturais podem apresentar atividade biológica, sendo que o grau da bioatividade pode variar de acordo com a estrutura e características deste polissacarídeo. Portanto, a modificação da estrutura química destes polímeros pode proporcionar uma oportunidade para melhorar sua atividade biológica (WANG *et al.*, 2018; LIANG *et al.*, 2017). Neste sentido, a sulfatação química de polissacarídeos vem ganhando destaque na literatura nas últimas duas décadas (BEDINI *et al.*, 2017). Assim, o estudo de polissacarídeos sulfatados está crescendo cada vez mais, uma vez que se comprovou que eles possuem uma variedade de atividades biológicas, incluindo atividades antioxidantes, antitumoral, antirradiação, antiviral, imunorreguladoras e anticoagulantes (WANG *et al.*, 2018; XU, *et al.*, 2019; BAE *et al.*, 2009).

As atividades anticoagulante e antitrombótica estão entre as propriedades mais amplamente estudadas dos polissacarídeos sulfatados (MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2018). Os anticoagulantes apresentam um papel importante na prevenção da coagulação em diferentes situações, como nos testes sanguíneos *in vitro*, para o tratamento do sangue durante hemodiálise e cirurgias, e como um medicamento para tratar a coagulação intravascular disseminada e as doenças tromboembólicas (CIPRIANI *et al.*, 2009; ALQUWAIZANI *et al.*, 2013).

A heparina é o anticoagulante mais usado na medicina clínica, sendo também um dos fármacos mais antigos, utilizada desde 1935 para este fim (ODUAH; LINHARDT; SHARFSTEIN, 2016). A heparina é um polissacarídeo sulfatado pertencente à classe dos glicosaminoglicanos (GAG). Atualmente, também é possível obter heparinas de baixa massa molecular (HBMM), obtidas por despolimerização parcial da heparina não fracionada (HNF) (CASU; NAGGI; TORRI, 2015). Quando comparados à HNF, as HBMM têm uma afinidade menor para as proteínas plasmáticas, células endoteliais e macrófagos, e apresentam melhor biodisponibilidade e farmacocinética com respostas de dose mais previsíveis (TORRI; NAGGI; 2016).

Entretanto, o uso da heparina, de forma geral, apresenta efeitos adversos, como hemorragia, trombocitopenia, osteoporose, reações gerais de

hipersensibilidade, entre outros (ONISH *et al.*, 2016). Além disso, devido à sua origem animal, há uma grande preocupação com a sua contaminação por agentes patogênicos (MAAS *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2015).

Como alternativas à heparina, muitos estudos têm apresentado a possibilidade do uso de polissacarídeos naturalmente ou quimicamente sulfatados. Dentre os polissacarídeos quimicamente sulfatados, a pectina cítrica (PC) sulfatada, apresentou grande potencial para ser usada como agente anticoagulante e antitrombótico (CIPRIANI *et al.*, 2009; BAE *et al.*, 2009; MAAS *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2015; SANTANA *et al.*, 2016; ROMÁN *et al.*, 2017). Entretanto, ainda verificam-se possibilidades de modificações em sua estrutura e de otimização do seu processo de sulfatação, objetivando uma molécula com um melhor desempenho anticoagulante. O estudo da sulfatação química de polissacarídeos torna-se gradativamente um dos focos de pesquisa, pois podem fornecer uma oportunidade para aprimorar suas atividades biológicas. Por conseguinte, estudos nessa área podem colaborar ainda mais para a potencial aplicação de polissacarídeos sulfatados como agentes anticoagulantes alternativos à heparina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A formação anormal de coágulos ocorre quando há disfunção de elementos específicos do processo da cascata de coagulação, o que pode levar, por exemplo, a sangramentos anormais ou à trombose. Para a prevenção desses problemas, faz-se o uso de medicamentos anticoagulantes. O principal fármaco utilizado para esta finalidade é a heparina, entretanto, a mesma pode apresentar efeitos adversos em pacientes. Em vista disso, muitos estudos visam buscar alternativas a este medicamento, entre eles, o estudo de polissacarídeos sulfatados vem ganhando destaque na literatura, demonstrando o potencial destes como agentes anticoagulantes. Dentre os polissacarídeos estudados, muitas pesquisas têm apresentado o potencial uso da pectina cítrica.

2.1 HEMOSTASIA

A hemostasia é um processo fisiológico natural que interrompe o sangramento no local de uma lesão enquanto mantém o fluxo sanguíneo normal em outras partes da circulação. A perda de sangue é interrompida pela formação de um tampão hemostático (GALE, 2011). O sistema hemostático se baseia em um delicado equilíbrio no qual ocorrem complexas interações entre as proteínas da coagulação plasmática, os elementos celulares e a parede do vaso para proteção contra hemorragias (FRANCHINI, 2006), ou seja, envolve a interação de vasoconstrição, agregação plaquetária e coagulação, visando interromper o sangramento (RAU *et al.*, 2007).

A hemostasia, pode ser dividida em dois processos. Tem-se a hemostasia primária, que se refere à agregação plaquetária e formação do tampão plaquetário. Para isso, as plaquetas são ativadas e, como resultado, aderem ao local da lesão e umas às outras, obstruindo a lesão. Já a hemostasia secundária refere-se à deposição de fibrina insolúvel, que é gerada pela cascata de coagulação. Essa fibrina insolúvel forma uma espécie de rede que é incorporada ao tampão plaquetário e ao redor dele. Essa malha serve para fortalecer e estabilizar o coágulo sanguíneo. Esses dois processos acontecem simultaneamente e estão mecanicamente interligados (GALE, 2011).

A via da fibrinólise também desempenha um papel significativo na hemostasia. O papel do sistema fibrinolítico é dissolver coágulos sanguíneos durante o processo de cicatrização de feridas e prevenir a formação de coágulos em vasos sanguíneos saudáveis (GALE, 2011; RAU *et al.*, 2007; BERNA-ERRO *et al.*, 2013).

Portanto, o processo de hemostasia se resume à: 1- adesão de plaquetas à parede do vaso lesado e agregação plaquetária, que resulta no desenvolvimento de um tampão plaquetário em combinação com vasoconstrição, como uma primeira defesa do organismo contra o sangramento após o rompimento da integridade do sistema vascular; 2- geração de um coágulo de fibrina, que ocorre por resultado da formação de α -trombina (FIIa) e consequente conversão de fibrinogênio em fibrina, que é o produto final após a ativação de vários fatores de coagulação do plasma; e por fim 3- a remoção da fibrina, que é uma função do sistema fibrinolítico (LEVI; SVAPALARATNAM, 2019).

Quando há o equilíbrio entre os sistemas pró-coagulantes (como o desencadeamento da ativação das plaquetas e da cascata de coagulação) e os sistemas anticoagulantes (como a fibrinólise), tem-se a hemostasia em equilíbrio. Entretanto, se a hemostasia estiver desequilibrada, como por exemplo, alguma irregularidade em um desses sistemas, pode-se ter ocorrência de trombose (coagulação excessiva) ou sangramento anormal (coagulação insuficiente) (GALE, 2011). Em alguns casos, as anormalidades do sistema de coagulação podem ter efeitos prejudiciais (FRANCHINI, 2006), por exemplo, a coagulação excessiva pode causar acidentes vasculares cerebrais, ataques cardíacos e embolia pulmonar (JIN; GOPINATH, 2016).

2.2 CASCATA DE COAGULAÇÃO

A hemostasia e a fibrinólise, processos biológicos que mantêm o fluxo sanguíneo adequado, são consequência de uma série complexa de reações enzimáticas em cascata (RAU *et al.*, 2007). Um processo crucial na hemostasia é a coagulação do sangue, que desempenha o papel de transformação do sangue do estado líquido para o sólido, com a ajuda de fatores de coagulação (JIN; GOPINATH, 2016), por meio da conversão de uma molécula solúvel, fibrinogênio, em uma molécula insolúvel, fibrina, sendo o fator Ila, a enzima responsável por essa conversão (OLSON, 2015). Existem cerca de 30 tipos de proteínas envolvidas neste processo,

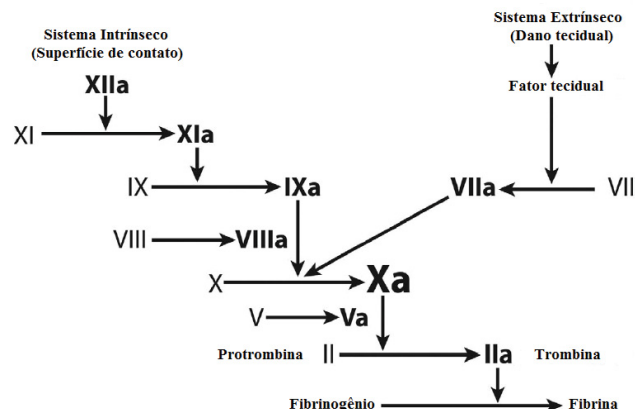
levando à formação de um tampão hemostático após a lesão vascular (JIN; GOPINATH, 2016).

O processo de coagulação, também conhecido como cascata de coagulação, é constituído por uma série de reações enzimáticas que envolvem a ativação sequencial de várias pró-enzimas plasmáticas circulantes - os fatores de coagulação. Cada fator de coagulação ativado, por sua vez, ativa uma pró-enzima subsequente na sequência (JAY; LUI, 2006). É um processo dinâmico de amplificação de sinal e modulação (DEVLIN, 2002).

Os fatores da via de coagulação geralmente circulam em um estado inativo até serem ativados por proteólise (RAU *et al.*, 2007). A enzima responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina é o fator IIa, sendo que a geração do fator IIa a partir de seu zimogênio, a protrombina, é o resultado de uma cascata regulada por reações enzimáticas (OLSON, 2015). Na formação da protrombina, duas vias estão envolvidas, denominadas vias intrínseca e extrínseca, que estão conectadas entre si e possuem ao final uma via comum (JIN; GOPINATH, 2016).

A separação "clássica" do sistema de coagulação em uma parte intrínseca e extrínseca, proposta nos anos de 1960, é relevante apenas para a hemostasia *in vitro*, porém ela não ocorre *in vivo* como vias independentes (LEVI; SIVAPALARATNAM, 2019; HOFFMAN, MONROE, 2007). Embora tenha sido tradicional e ainda útil para a interpretação dos testes de coagulação *in vitro*, fisiologicamente a cascata da coagulação não está dividida em duas vias com mecanismos de gatilho independentes (JAY; LUI, 2006). O esquema da cascata de coagulação é apresentado na Figura 1.

FIGURA 1 – MODELO VIA EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA DA CASCATA DE COAGULAÇÃO.



FONTE: Adaptado de JAY e LUI (2006).

A via extrínseca ocorre por 8 a 15 s, enquanto a via intrínseca ocorre por 1 a 6 min quando há um dano ao vaso sanguíneo (JIN; GOPINATH, 2016). A principal via para a ativação da coagulação é através da via do fator tecidual-fator VII (rotulada como “sistema extrínseco”) (LEVI; SVAPALARATNAM, 2019).

O fator tecidual (FT), fator III ou tromboplastina, é um receptor transmembrana que não é exposto ao sangue em circunstâncias normais. Ele está localizado nas estruturas subendoteliais e entra em contato com o sangue circulante após a ruptura das células endoteliais vasculares, como por exemplo, em caso de cirurgia ou trauma (LEVI; SVAPALARATNAM, 2019). A geração de fator IIa é então iniciada quando o dano à parede de um vaso expõe o sangue ao FT no subendotélio, dando início à **via extrínseca**. O FT também é expresso por plaquetas ativadas e leucócitos. Portanto, a coagulação também pode ser iniciada por processos inflamatórios (RAU *et al.*, 2007).

Após a exposição do FT ao sangue, forma-se um complexo entre este receptor e o fator VII plasmático, acompanhado pela ativação do fator VII em VIIa (LEVI; SVAPALARATNAM, 2019). O fator VIIa só se liga ao FT na presença de Cálcio (Ca^{2+}) (DEVLIN, 2002). Esse complexo do FT-VIIa ativa o fator X plasmático em Xa (fator X ativado) (LEVI; SVAPALARATNAM, 2019). Juntos, os fatores Va e Xa formam o complexo de protrombinase, já na via comum, que então cliva uma pequena quantidade de protrombina (fator II) em α -trombina (fator IIa), a enzima final para a conversão de fibrinogênio em fibrina (RAU *et al.*, 2007).

Além disso, este complexo TF-VIIa ativa também indiretamente o fator IX, induzindo a ativação da via intrínseca por meio da formação do complexo de ativação do fator X intrínseco (JAY; LUI, 2006). O fator IIa formado também consegue ativar os fatores V, VIII e XI, realimentando o ciclo para aumentar a formação de fator IIa (RAU *et al.*, 2007).

A ativação do fator XI pelo fator XIIa na superfície das plaquetas irá induzir a **via intrínseca** (Figura 1). Plaquetas são ativadas ao entrarem em contato com o colágeno no local da lesão vascular, e expõem fosfolipídios negativamente carregados na parte externa da membrana plasmática. O fator XII liga-se diretamente a essa superfície aniônica e passa por uma mudança conformacional que aumenta sua atividade catalítica. Pré-caliceína e o fator XI, circulam no sangue como complexos separados com o cininogênio de alto peso molecular (HMWK), respectivamente na forma de complexos, pré-caliceína-HMWK e XI-HMWK (DEVLIN, 2002). Quando

esses componentes se colocam sobre a superfície das plaquetas ativadas, o fator XII é ativado a fator XIIa mediante proteólise pela calicreína. Esse fator XIIa, gerado pela calicreína, ataca a pré-calicreína para gerar mais calicreína, estabelecendo uma ativação recíproca. O fator XIIa, uma vez formado, ativa o fator XI a XIa (MURRAY *et al.*, 2007). Após essa ativação do fator XI pelo fator XIIa, será realizado a ativação do fator IX em IXa. Posteriormente, o fator IXa será o ativador para o fator X (JIN; GOPINATH, 2016). Essa última reação requer a montagem dos componentes, chamado de complexo tenase sobre a superfície das plaquetas ativadas, que inclui o Ca^{2+} , e os fatores VIIIa, IXa e X. E, como na via extrínseca, o fator Xa ativa o fator II em fator IIa, que posteriormente converte fibrinogênio em fibrina, sendo esses processos da via comum (MURRAY *et al.*, 2007).

Nessa última etapa, comum as duas vias, o fator IIa também ativa o fator XIII a XIIIa. O fator XIIIa promove a ligação covalente cruzada das moléculas de fibrina, dando origem a um coágulo de fibrina mais estável (MURRAY *et al.*, 2007).

Finalmente, o processo de dissolução do coágulo, processo chamado de fibrinólise, ocorre quando o vaso lesado está suficientemente bem reparado para impedir novos sangramentos (DEVLIN, 2002). A dissolução do coágulo de fibrina ocorre por meio da ação da enzima plasmina, que é formada a partir de plasminogênio, por ação do ativador de plasminogênio tecidual (t-PA). Plasminogênio tem alta afinidade pelo coágulo e forma complexos com fibrina. O t-PA também se liga aos coágulos de fibrina e ativa plasminogênio convertendo-o a plasmina. O coágulo é, então, solubilizado pela ação da plasmina (DEVLIN, 2002). De maneira autorregulatória, a fibrina atua como cofator para a ativação do plasminogênio e substrato para a plasmina. Na presença de fibrina, o tPA cliva o plasminogênio em plasmina, que proteolisa a fibrina. Por ser um cofator necessário para a reação, a degradação da fibrina limita a ativação posterior do plasminogênio (RAU *et al.*, 2007).

Além do processo de fibrinólise, há outras vias de inibição da coagulação. Por exemplo, a inibição da via extrínseca, ou seja, do complexo FT-VIIa- Ca^{2+} -Xa, envolve uma interação específica com o inibidor da via do fator tecidual (TFPI). Os domínios do TFPI ligam-se aos fatores Xa e VIIa. A ligação do TFPI com o fator VIIa não ocorre a menos que o fator Xa esteja presente (DEVLIN, 2002). Assim, com o TFPI, ocorre a inibição dos fatores na via extrínseca.

Outros inibidores de proteinases do sangue interagem com outras enzimas do sistema de coagulação do sangue. A maior parte desses inibidores se encaixa na

família das proteínas inibidores de serino proteases, as serpinas (DEVLIN, 2002). Um exemplo de serpina é a antitrombina III (AT), que inibe preferencialmente o fator IIa e o FXa (JIN; GOPINATH, 2016). O cofator II da heparina (HCII) também inibe o fator IIa, mas não outras proteases de coagulação, sendo que o HCII contribui com em torno de 20-30% da inibição do fator IIa (RAU *et al.*, 2007).

Outra proteína envolvida no processo de anticoagulação é a proteína C. Ela é ativada num complexo ligado à membrana, com fator IIa, trombomodulina e íons cálcio. Proteína C em presença de outro cofator proteico, proteína S, inibe a coagulação por inativar os fatores Va e VIIIa (DEVLIN, 2002; GALE, 2011). A trombomodulina, uma glicoproteína integral de membrana das células endoteliais, atua como um receptor de fator IIa. No complexo fator IIa-trombomodulina-Ca²⁺, fator IIa tem especificidade diminuída para fibrinogênio e especificidade aumentada para proteína C. Portanto, o papel do fator IIa muda de pró-coagulante para anticoagulante (DEVLIN, 2002).

Portanto, verifica-se a importância dos fatores de coagulação no sistema hemostático, tanto os fatores pró-coagulantes quanto os anticoagulantes. Para monitorar o processo de coagulação são utilizados testes *in vitro* e, por isso, a divisão da coagulação em duas vias permite de forma mais didática a compreensão do fenômeno.

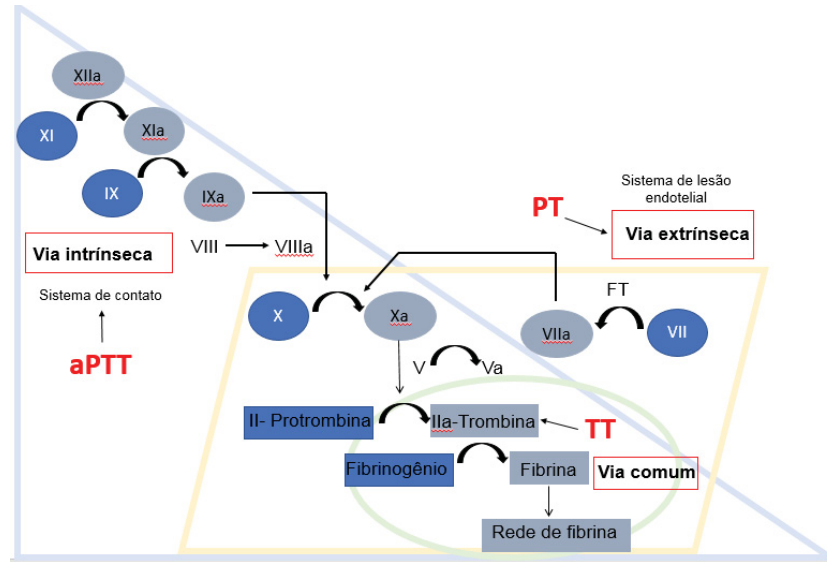
2.2.1 Avaliação da coagulação *in vitro*

O sistema hemostático pode ser monitorado por diversos exames laboratoriais. Como exemplo, a maioria dos ensaios convencionais de triagem para o sistema de coagulação do plasma são realizados através do tempo de protrombina (PT), tempo de trombina (TT) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT). Esses testes não correspondem perfeitamente à coagulação *in vivo*, mas são maneiras simples de avaliar a cascata de coagulação e a ação de anticoagulantes (LEVI; SVAPALARATNAM, 2019).

Os testes de triagem de coagulação são anormais quando há deficiência de um ou mais fatores de coagulação, e também quando o sangue está sob ação de anticoagulantes (HOFFMAN; MONROE, 2007).

Os testes *in vitro*, aPTT, PT e TT, medem o tempo decorrido desde a ativação da cascata de coagulação em diferentes pontos até a geração da fibrina (RABER, 1990), como apresentado na Figura 2.

FIGURA 2 – PONTO DE INÍCIO DOS TESTES DE COAGULAÇÃO *IN VITRO*.



Fonte: Adaptado de FAVALORO; LIPPI; KOUTTS (2011).

O **tempo de protrombina (PT)** é um dos testes laboratoriais mais realizados em todo o mundo (MIJOVSKI, 2019). O PT mede o tempo necessário para gerar fibrina após a ativação do fator VII. Ele mede a integridade das vias "extrínseca" e "comum". Dessa forma, avalia os fatores VII, V, X, protrombina e fibrinogênio (RABER, 1990). Esse teste pode ser realizado da seguinte maneira: um reagente de tromboplastina de tecido preparado comercialmente, que contém o fator tecidual, uma fonte de fosfolípido e cálcio, é adicionado ao plasma anticoagulado com citrato de sódio. A partir da adição, o tempo é monitorado até a formação de filamentos de fibrina, ou seja, até a formação de coágulos, sendo então anotando o tempo transcorrido nesse processo (MIJOVSKI, 2019; RABER, 1990).

Um PT prolongado pode refletir a deficiência de algum fator de coagulação ou a ação de um agente anticoagulante (FAVALORO; LIPPI; KOUTTS, 2011). O PT também é utilizado para monitorar o tratamento com anticoagulantes antagonistas à vitamina K, como a varfarina (LEVI; SVAPALARATNAM, 2019).

Já o **tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)** mede o tempo necessário para gerar a fibrina desde o início da via intrínseca. A ativação do fator XII

é realizada com um agente externo, por exemplo com caulim, capaz de ativar o fator XII sem ativar o fator VII. Como plaquetas são necessárias para que a cascata funcione normalmente, o teste é realizado na presença de uma emulsão fosfolipídica que as substitui. O aPTT depende do contato do plasma com superfícies de cargas negativas para ativação (RABER, 1990). Assim, no teste do aPTT o plasma é incubado com um ativador de contato, como sílica ou ácido elágico, e fosfolípidos (referidos como tromboplastina parcial). A coagulação é desencadeada com cálcio e o tempo para a formação do coágulo é registrado.

O aPTT reflete, então, a atividade dos fatores de coagulação da via intrínseca e comum, entre eles, os fatores XII, XI, IX, X, VIII, II e I. O aPTT é prolongado em casos de deficiência de fator de coagulação, quininogênio de alto peso molecular, ou deficiência de pré-caliceína, e presença de medicamentos anticoagulantes (MIJOVSKI, 2019; FAVALORO; LIPPI; KOUTTS, 2011). Além disso, também é possível verificar distúrbios hereditários, como hemofilia A (deficiência de fator VIII) e hemofilia B (deficiência de fator IX), doenças que são bem conhecidas nas quais o aPTT é prolongado (RABER, 1990). O aPTT também é o teste de escolha para monitorar a terapia com heparina, porque é sensível a todos os fatores de coagulação que esse medicamento tem como alvo (MIJOVSKI, 2019).

Por fim, o teste de **tempo de trombina (TT)** mede o tempo necessário para conduzir a reação do fibrinogênio à fibrina na presença de fator IIa, como apresentado na Figura 2, o último passo na cascata de coagulação, avaliando, portanto, a via comum (MIJOVSKI, 2019).

Nesse teste, fator IIa é adicionada ao plasma citratado, e o tempo de coagulação é medido desde a adição de fator IIa até a geração dos filamentos de fibrina. Nesse processo os fatores não são dependentes de cálcio, assim torna-se desnecessária a sua adição (RABER, 1990).

O prolongamento no TT podem ser devido a fibrinogênio deficiente, fibrinogênio anormal ou a presença de algum inibidor de reação (RABER, 1990). O TT também é sensível à heparina, mas só é útil para ajudar a revelar a presença ou ausência da heparina, ou seja, acaba não sendo útil para o monitoramento da terapia com heparina, pois o teste não apresenta linearidade na sensibilidade à heparina ao longo do intervalo terapêutico (FAVALORO; LIPPI; KOUTTS, 2011).

Verifica-se então a importância dos testes de coagulação na avaliação e monitoramento da capacidade de coagulação do sangue, uma vez que distúrbios nesse processo podem acarretar doenças.

2.2.2 Distúrbios na coagulação

A coagulação do sangue é um processo regulado e bem complexo, entretanto, podem haver desregulações na cascata de coagulação. Qualquer interrupção no sistema, como proteínas ou fatores de coagulação deficientes, ou superestimulação da cascata de coagulação, podem causar sangramento ou coagulação anormal (SMITH, 2021).

A coagulação excessiva pode causar derrames e ataques cardíacos, bem como embolia pulmonar, enquanto a falta do fator de coagulação do sangue pode originar doenças, como a doença de von Willebrand, hemofilia A, hemofilia B e hemofilia C (JIN; GOPINATH, 2016).

A doença de von Willebrand é um distúrbio hemorrágico causado por deficiência ou defeito no fator de von Willebrand. Este fator está envolvido na agregação plaquetária e também é um transportador do fator VIII. Assim, a deficiência do fator de von Willebrand causa defeitos na agregação plaquetária e também uma deficiência de fator VIII (GALE, 2011). É o distúrbio hemorrágico hereditário mais comum em todos os grupos étnicos e sexos, afetando até 1% da população (HAN *et al.*, 2021).

A hemofilia A é devida à deficiência do fator VIII, sendo um distúrbio ligado ao cromossomo X que resulta em vários graus de deficiência do fator VIII. Ela ocorre em cerca de 1 em 5.000 nascimentos do sexo masculino (HAN *et al.*, 2021). Já a hemofilia B, é também um distúrbio ligado ao cromossomo X, com deficiência do fator IX. Sua incidência é de aproximadamente 1 em 25.000 nascimentos do sexo masculino (HAN, *et al.*, 2021). O fator VIII ativado e o fator IX ativado juntos formam um complexo, que é crítico no ciclo de feedback positivo da coagulação do sangue. Portanto, a deficiência de qualquer uma dessas proteínas causa um fenótipo de sangramento muito semelhante, caracterizado por excesso de hematomas, sangramento espontâneo nas articulações, músculos, órgãos internos e no cérebro (GALE, 2011). Por fim, a hemofilia C é decorrente da deficiência do fator XI, e é herdada em um

padrão autossômico recessivo, sendo relatada em aproximadamente 1:1 milhão de pacientes, atingindo ambos os sexos (HAN *et al.*, 2021).

Além das coagulopatias congênitas, tem-se as coagulopatias adquiridas como a coagulação intravascular disseminada, deficiência na vitamina K, traumas e lesões (HAN *et al.*, 2021).

A coagulação intravascular disseminada (CID) é um distúrbio em que coagulação e sangramento ocorrem simultaneamente. A síndrome começa com coagulação excessiva. A coagulação incessante ocorre devido à estimulação contínua do fator pró-coagulante. Como resultado, as plaquetas e os fatores de coagulação são reduzidos à medida que mais coágulos são formados. Este processo contínuo resulta em sangramento quando as plaquetas e fatores de coagulação são consumidos (SMITH, 2021). As condições predisponentes para CID incluem sepse/infecção, lesão cerebral traumática, transfusão de sangue incompatível, trauma, grandes anormalidades vasculares, afogamento, entre outros (HAN *et al.*, 2021). A CID pode ocorrer de forma aguda ou se desenvolver como uma condição crônica, em situações agudas, a CID é fatal (SMITH, 2021).

A vitamina K é uma vitamina lipossolúvel, sendo necessária para a γ -carboxilação dos fatores II, VII, IX e X da cascata de coagulação, uma mudança pós-traducional. Na ausência de vitamina K esses fatores são produzidos com uma estrutura final errada. Portanto, de forma indireta a vitamina K também exerce influência na cascata de coagulação (HAN *et al.*, 2021).

Outro exemplo é a coagulopatia traumática aguda (CTA). Ela é a principal causa de morte em vítimas de trauma, como resultado de sangramento descontrolado. Fatores que agravam a CTA incluem acidose metabólica, hipotermia, hipoperfusão e hemodiluição. A hipotermia agrava a coagulopatia induzindo o sequestro hepático de plaquetas, reduzindo a função plaquetária e diminuindo a taxa de formação de fibrina, resultando em um coágulo de formação lenta e fraco. Hipotermia, acidose e hemodiluição levam à ativação do endotélio e à liberação de substâncias semelhantes à heparina que prejudicam a capacidade de coagulação do corpo, agravando mais a situação. Se não for tratada, a CTA resulta em morte (BASHAW; TRIPLETT, 2017).

A desregulação da coagulação sanguínea também é uma das razões críticas para várias doenças trombóticas. Com a formação anormal de coágulos há a obstrução dos vasos, sendo esse fenômeno conhecido como trombose. Essa situação

pode ocasionar isquemia de tecido, em que ocorre a obstrução do fluxo sanguíneo para os tecidos periféricos (XIE *et al.*, 2018).

A trombose arterial ocorre quando há o acúmulo de plaquetas agregadas, enquanto a trombose venosa é composta por fibrina com hemácias emaranhadas. Alguns dos fatores de risco clássicos para trombozes arteriais, como obesidade e colesterol alto, também são fatores de risco para trombose venosa. Os fatores de risco para a trombose venosa, como câncer, cirurgia, imobilização, fraturas e gravidez, causam um estado de hipercoagulabilidade e resultam em uma tendência aumentada para ativação da cascata de coagulação. Os fatores de risco genéticos incluem múltiplas variantes na cascata de coagulação (GALE, 2011).

Além disso, a coagulopatia também está associada com a COVID-19, sendo uma das complicações da doença, que pode levar a trombose, danos a múltiplos órgãos e morte (SALABEI *et al.*, 2021). O coronavírus SARS-CoV-2 está associado à coagulação do sangue, como um estágio pró-trombótico, que é causado pelo tromboembolismo arterial e venoso. A COVID-19 associada à produção de citocinas pró-inflamatórias medeiam a ativação de células mononucleares e endoteliais com a expressão do FT, levando à ativação da coagulação e geração de trombose. A disfunção da célula endotelial mediada pela infecção por COVID-19 resulta em maior produção de fator IIa e interrompe a fibrinólise, o que leva ao quadro de hipercoagulopatia (VINAYAGAM, SATTU, 2020).

Portanto, verifica-se a importância da coagulação do sangue para o processo hemostático, e como a sua falta ou desregulação, pode ocasionar sérias doenças. Por conseguinte, os anticoagulantes apresentam um papel vital para o tratamento dos distúrbios da coagulação e, conseqüentemente, das doenças correlacionadas (JIN; GOPINATH, 2016).

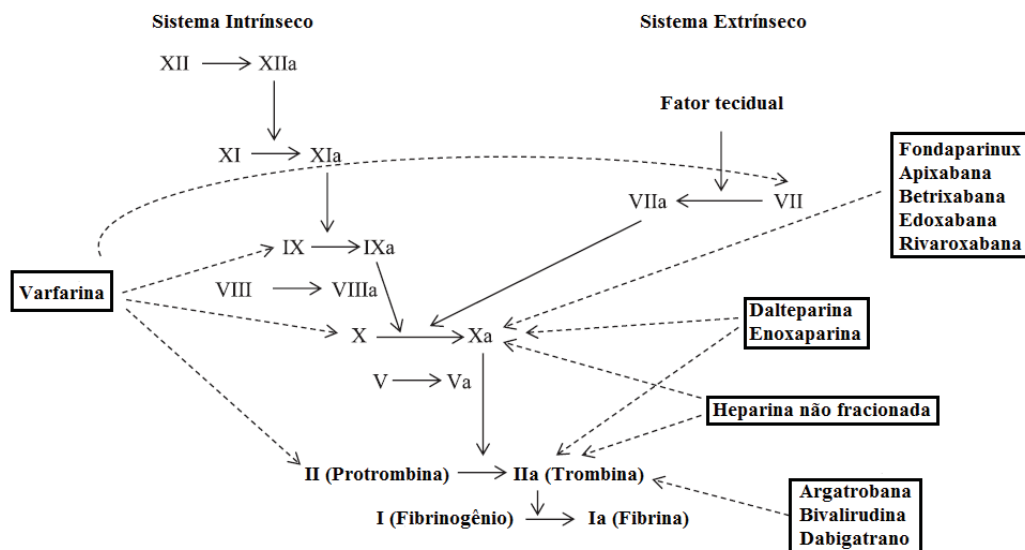
2.3 ANTICOGULANTES

Os anticoagulantes são fármacos usados na prevenção da coagulação, atuando diretamente ou indiretamente na cascata de coagulação, com a finalidade de inibir a ação dos fatores de coagulação (MIJOVSKI, 2019). Os medicamentos anticoagulantes são compostos químicos ou podem ser formados por proteínas (JIN; GOPINATH, 2016).

Os anticoagulantes são usados para prevenção e tratamento de trombose e seus distúrbios, como distúrbios cardiovasculares, em cirurgias, e como terapia anticoagulante, assim como para demais prevenções à distúrbios da coagulação (ALQUWAZANI *et al.*, 2013; JIN; GOPINATH, 2016).

Eles são classificados em dois grupos de acordo com o modo de aplicação, ou seja, medicamentos parenterais e orais (MJOVSKI, 2019). As opções de tratamento com anticoagulantes aumentaram nos últimos 10 anos, com o desenvolvimento e a disponibilidade em larga escala de inibidores diretos na cascata de coagulação, por exemplo, inibidores orais da FIIa e FXa. Portanto, tem-se um conjunto de fármacos existentes administradas por via intravenosa, subcutânea ou oral na prevenção de distúrbios da coagulação (DEWALD; WASHAM, 2018). Os locais de ação dos anticoagulantes na cascata de coagulação são apresentados na Figura 3.

FIGURA 3 – LOCAIS DE AÇÃO DE ANTICOGULANTES COMERCIAIS NA CASCATAS DE COAGULAÇÃO.



Fonte: Adaptado de DEWALD e WASHAM (2018).

A varfarina, de uso oral, e a heparina, medicamento parental, são os anticoagulantes clássicos, vastamente usados para prevenção da coagulação. A varfarina age como antagonista da vitamina K, bloqueando a biossíntese de fatores de coagulação dependentes da vitamina K, como os fatores VII, IX, X e II. Já a heparina age por ativação da antitrombina, um inibidor natural da enzima fator IIa e de outros fatores da coagulação, causando uma alteração conformacional na

antitrombina, que resulta em sua ativação e, em seguida, inativação do fator IIa, do fator Xa e outras proteases. Ambas têm sido utilizadas no tratamento da doença trombotica há muitos anos, possuindo alta eficácia e boa relação custo-benefício, no entanto, podem causar diversos efeitos adversos, como risco de sangramento, trombocitopenia, interações medicamentosas, etc (XIE *et al.*, 2018).

Além destes dois anticoagulantes, há também outros anticoagulantes com ação inibitória para o fator IIa e para o fator Xa. Os inibidores diretos do fator IIa inibem especificamente e reversivelmente o fator IIa livre e ligada ao coágulo, ligando-se ao sítio ativo do fator IIa. A argatrobana é um exemplo de inibidor direto univalente do fator IIa, ela se liga apenas ao sítio catalítico ativo do fator IIa, agindo como um inibidor competitivo do fator IIa. Já a bivalirudina é um inibidor bivalente do fator IIa, ligando-se ao sítio catalítico ativo e ao sítio de reconhecimento do substrato (exosítio 1) da molécula de fator IIa. Com a inibição da ação do fator IIa tem-se, conseqüentemente, a diminuição da geração de fibrina (DEWALD; WASHAM, 2018). Dabigatrana também é um inibidor direto do fator IIa, muito usado na prática clínica (BABER; MASTORIS; MEHRAN, 2014).

Dentre os inibidores seletivos para o fator Xa tem-se o Fondaparinux, que é um pentassacarídeo sulfatado sintetizado quimicamente, sendo uma classe de heparina de baixa massa molecular, que tem como alvo específico a antitrombina. Após a ligação à antitrombina, ocorre uma mudança conformacional permanente na molécula que causa um aumento da afinidade para o fator Xa, impedindo a ação deste. O Fondaparinux não inibe o fator IIa diretamente, mas leva à inativação do fator Xa por meio da antitrombina (DEWALD; WASHAM, 2018). Outra classe de heparina de baixa massa molecular é a Enoxaparina, que também se liga e altera a conformação da AT, e conseqüentemente, aumenta a inativação do fator Xa (PANNUCCI *et al.*, 2017).

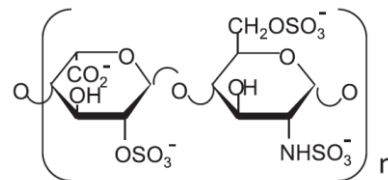
Outros inibidores diretos do fator Xa também foram desenvolvidos, como Apixabana, Betrixabana, Edoxabana e Rivaroxabana, sendo medicamentos de uso oral (MAKARYUS; HALPERIN; LAU, 2013). Esses medicamentos inibem seletivamente o fator Xa livre e ligado ao coágulo, se ligando diretamente ao sítio ativo do fator Xa, inibindo a sua ação, impedindo a geração de fator IIa (DEWALD; WASHAM, 2018).

Dentre os anticoagulantes a heparina é o mais empregado, sendo usada na prática clínica há mais de 90 anos (ONISH *et al.*, 2016).

2.4 HEPARINA

A heparina foi descoberta em 1916 pelos pesquisadores Jay McLean e John Henry Hopkins. Ela é um glicosaminoglicano (GAG) constituído por sequências dissacarídicas de um ácido urônico (IdoAp ou GlcAp) e GlcNAcp, unidos entre si por ligações glicosídicas 1→4, e com um padrão de sulfatação complexo de N- e O-sulfatos (CASU; NAGGI; TORRI, 2014; MARCUM, 1997; ODUAH; LINHARDT; SHARFSTEIN, 2016), como apresentado na Figura 4.

FIGURA 4 – ESTRUTURA DA HEPARINA: PRINCIPAIS UNIDADES DE REPETIÇÃO DE DISSACARÍDEOS TRISSULFATADOS PRESENTES EM SUA ESTRUTURA



Fonte: CASU, NAGGI e TORRI (2015).

A heparina está presente nos mastócitos, sendo a heparina não fracionada (HNF) obtida por purificação de tecido animal, mais comumente intestino suíno. Sua introdução na medicina clínica foi um avanço monumental na década de 1930 devido à escassez de alternativas anticoagulantes clinicamente disponíveis. Trabalhos posteriores levaram ao seu início no uso clínico em 1935. Desde então, a heparina tem sido estudada para várias aplicações e modificações (ODUAH; LINHARDT; SHARFSTEIN, 2016). A heparina é amplamente utilizada como anticoagulante e antitrombótico, com um mercado anual de 7 bilhões de dólares (CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019).

A HNF é uma escolha desejável para quando se necessita de um efeito anticoagulante rápido, devido ao seu rápido início de ação quando administrada por via intravenosa. A HNF é uma mistura de moléculas de heparina de comprimentos e massas moleculares variáveis (entre 5 e 40 kg/mol). Os efeitos anticoagulantes e propriedades farmacológicas variam com o tamanho das moléculas (DEWALD; WASHAM, 2018), podendo ser administrada por via intravenosa ou subcutânea,

sendo que a biodisponibilidade subcutânea depende da massa molecular da heparina (ONISH *et al.*, 2016).

A heparina é biossintetizada no retículo endoplasmático e no Golgi dos mastócitos, que estão presentes em maior número no fígado, intestinos e pulmões. Sua extração advém de fonte animal, incluindo bovinos e suínos, sendo a mucosa intestinal suína a principal fonte de obtenção (ONISH *et al.*, 2016).

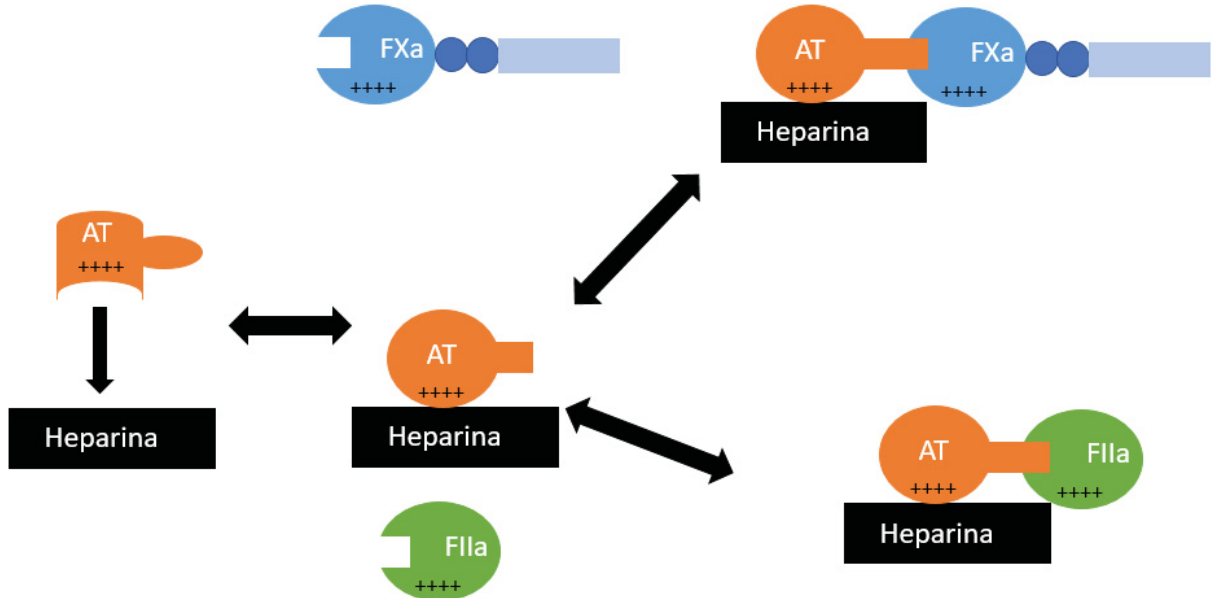
A sua biossíntese ocorre quando um ligante de tetrassacarídeo é anexado a um resíduo de serina em uma proteína central, a serglicina, e então as unidades de dissacarídeo de ácido β -D-GlcAp-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAcp são adicionadas. A sulfatação dos dissacarídeos e epimerização do glucuronato em iduronato é realizada por várias enzimas na via biossintética. Há um total de 12 enzimas envolvidas na via, que atuam em conjunto para produzir a molécula desejada. No entanto, muitas dessas enzimas têm várias isoformas, o que pode ser responsável pela heterogeneidade da heparina (ODUAH; LINHARDT; SHARFSTEIN, 2016).

O mecanismo de sua ação anticoagulante é atribuído a interação com proteases da cascata da coagulação, como a fator IIa (FIIa) e o fator X ativado (FXa), e seus inibidores naturais, a AT e HCII, potencializando a ação destes últimos, e levando à inativação da coagulação (CASU; NAGGI; TORRI, 2015).

A heparina induz efeito anticoagulante por promover alterações na estrutura da AT, fornecendo locais para a ligação do fator Xa e do fator IIa à AT. Isso pode ocorrer por dois mecanismos diferentes para a ativação da AT pela heparina, um deles dependente exclusivamente de uma sequência pentassacarídica específica na heparina e o outro de uma molécula de heparina de pelo menos 18 resíduos de monossacarídeos (JIN; GOPINATH, 2016). Em ambos os mecanismos, um local carregado positivamente na AT liga-se a uma sequência específica de um pentassacarídeo carregado negativamente na heparina. Essa ligação induz uma mudança conformacional na AT (OLSON *et al.*, 2010). Apenas cerca de 30% das cadeias de heparina contêm esta sequência (ONISH *et al.*, 2016). As alterações alostéricas ativam especificamente a reatividade da AT com os fatores Xa e IXa, favorecendo as interações deles com a AT. Contudo, o mecanismo alostérico afeta minimamente a reatividade da AT com o fator IIa, uma vez que o fator IIa não interage com os exossítios da AT que se ligam aos fatores Xa e IXa (OLSON *et al.*, 2010). Já uma molécula de heparina contendo pelo menos 18 resíduos de monossacarídeos é necessária para ligar ao fator IIa e à AT, formando um complexo ternário (ONISH *et*

al., 2016). São heparinas de cadeia mais longa que ativam a reatividade da AT com o fator IIa e aumentam ainda mais sua ação anticoagulante (OLSON *et al.*, 2010). Um esquema da ação da heparina com a AT é apresentado na Figura 5.

FIGURA 5 – MECANISMO DE AÇÃO DA HEPARINA NA ATIVAÇÃO DA ANTITROMBINA.



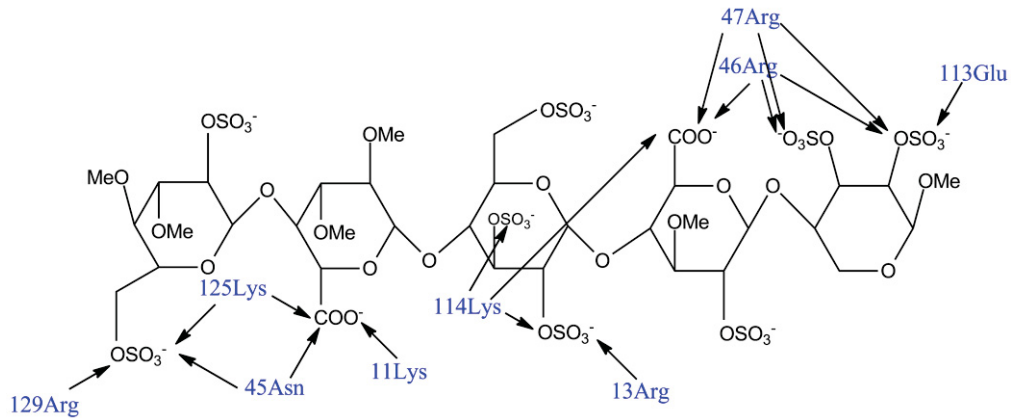
AT = Antitrombina; FIIa = α -trombina; FXa = Fator Xa.

Fonte: Adaptado de JIN e GOPINATH (2016).

Como exposto na Figura 5, mudanças na conformação da AT são induzidas pela ligação à heparina, facilitando a interação da AT ao fator Xa e IIa, inativando-os (ONISH *et al.*, 2016). A heparina aumenta a inibição do fator IIa por um fator de aproximadamente 9000 vezes e a inibição do fator Xa por um fator em torno de 17000 vezes (DEVLIN, 2002).

O sítio de ligação do pentassacarídeo da heparina na AT, necessário para a inativação do fator Xa, ocorre através da interação de resíduos básicos carregados positivamente em cada uma dessas regiões, incluindo Lys11, Arg13, Arg46, Arg47, Lys114, Lys125 e Arg129, que interagem através de ligações iônicas e de hidrogênio com grupos sulfato e carboxílicos carregados negativamente no pentassacarídeo da heparina (OLSON *et al.*, 2010), como mostrado na Figura 6.

FIGURA 6 – INTERAÇÃO ENTRE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS DE AT COM A HEPARINA^{1,2}.



- 1- As setas indicam as interações entre os resíduos de aminoácidos da AT com os grupos presentes na estrutura da heparina.
- 2- A figura 6 representa um pentassacarídeo sintético utilizado pelos autores Whisstock *et al.* (2000) em seu estudo.

Fonte: Adaptado de WHISSTOCK *et al.* (2000).

O HCII também tem sua atividade aumentada na presença da heparina. O HCII inibe somente o fator IIa e não tem ação sobre outras proteases da coagulação, sendo que essa serpina pode contribuir com 20 a 30% para a inibição do fator IIa (RAU *et al.*, 2007). Análogo à AT, também foi proposto que quando o HCII se liga com a heparina, ele sofre uma mudança conformacional que aumenta sua reatividade com ao fator IIa, potencializando sua ação. Foi demonstrado que o menor comprimento de heparina capaz de se ligar fortemente ao HCII era de 13 unidades de monossacarídeos, e que a maior parte do efeito de aceleração era devido a essa mudança alostérica na conformação do HCII (O'KEEFFE *et al.*, 2004). O HCII é único entre as serpinas que tem a capacidade de ser estimulado pelo sulfato de dermatan. Sendo que a taxa de inibição da fator IIa pelo HCII aumenta mais de 1000 vezes na presença de heparina, heparan sulfato ou dermatan sulfato (HE *et al.*, 2001).

Como já abordado, a inativação efetiva do fator IIa requer que o fragmento da heparina seja longo o suficiente para se ligar à fator IIa e AT simultaneamente, um efeito que ocorre apenas se a cadeia do fragmento de heparina exceder 18 unidades de monossacarídeos, comumente encontradas em HNF. Em contraste, este tipo de ligação simultânea não é necessário para a inativação do Fator Xa com AT (JAY; LUI, 2006). A observação de que sequências menores de heparina ainda podiam interagir com AT e potencializar o efeito inibitório dela sobre o fator Xa, desencadeou o desenvolvimento de heparinas de baixa massa molecular (HBMMs) como agentes

antitrombóticos com menor atividade anticoagulante. Entretanto, as HBMMs apresentam os mesmos riscos de sangramento que a HNF mas, apesar disso, elas têm obtido sucesso crescente, principalmente por causa de suas melhores propriedades farmacocinéticas e fácil controle das doses terapêuticas (JIN; GOPINATH, 2016). Isso ocorre porque na HBMM as ligações com proteínas são reduzidas, o que melhora suas propriedades farmacocinéticas e resulta em uma resposta anticoagulante mais previsível, assim como, uma interação reduzida com as plaquetas, o que conseqüentemente reduz a formação de anticorpos envolvidos com a trombocitopenia induzida por heparina (DEWALD; WASHAM, 2018).

Obtidas originalmente por fracionamento da heparina, as HBMMs são derivadas da despolimerização química ou enzimática da HNF (DEWALD; WASHAM, 2018; JIN; GOPINATH, 2016; JAY; LUI, 2006). O processo geral cria fragmentos que têm aproximadamente um terço da massa molecular da HNF e também são heterogêneos em tamanho (JAY; LUI, 2006; DEWALD; WASHAM, 2018). A massa molecular das HBMMs varia entre 4 a 5 kg/mol, o que permite uma aplicação subcutânea dessas moléculas (ONISH *et al.*, 2016).

A modificação química altera várias propriedades das HBMMs. Semelhante à HNF, as HBMMs também interagem com a AT para a inibição dos fatores de coagulação, entretanto, 50 a 75% das cadeias da HBMM são muito curtas e experimentam uma perda progressiva da capacidade de catalisar a inibição do fator IIa, ou seja, não são tão eficazes para a inibição do fator IIa (DEWALD; WASHAM, 2018). As HBMMs têm uma capacidade reduzida de inativar o fator IIa, pois apenas 25 a 50% das espécies de HBMM contêm as 18 unidades de monossacarídeos necessárias para formar um complexo ternário com AT e fator IIa. Apesar dessa limitação, as HBMMs ainda inativam o fator Xa, uma vez que este processo requer apenas um pentassacarídeo (ONISH *et al.*, 2016). Um exemplo de medicamento anticoagulante da classe das HBMMs é a Enoxaparina (CASU; NAGGI; TORRI, 2015).

Com isso, gerou-se um interesse na exploração farmacêutica das frações de massa molecular inferior à HBMM. Estudos foram feitos usando, principalmente, despolimerização controlada de heparina com heparina-liases recombinantes, para obter menores massas moleculares, originando as heparinas de massa molecular ultrabaixa (HMMUs). Além disso, vários outros oligossacarídeos de heparina foram isolados ao longo dos anos (CASU; NAGGI; TORRI, 2015). As HMMUs possuem massa molecular em torno de 1,5 a 3,5 kg/mol, e apresentam menores riscos de

sangramento. Um exemplo de medicamento anticoagulante de HMMUs é o Fondaparinux (ONISH *et al.*, 2016).

Apesar dos muitos benefícios que a heparina apresenta, a mesma também possui muitos efeitos adversos, como hemorragia, trombocitopenia, osteoporose, reações de hipersensibilidade em geral, entre outros (ONISH *et al.*, 2016).

Além de doenças, também houveram complicações na fabricação do medicamento. Em 2007, um surto de uma doença respiratória chamada doença da orelha-azulada em suínos na Ásia resultou em uma considerável escassez de heparina (MCCARTHY *et al.*, 2020).

Já no início de 2008, uma série de eventos adversos em pacientes recebendo injeções de heparina ocorreu nos EUA e em alguns países europeus, causando mais de cem mortes. A *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA abriu uma investigação e verificou-se que os efeitos adversos foram causados por um contaminante "não natural", um sulfato de condroitina totalmente O-sulfatado. Assim, desencadeou-se um estudo para melhorar os métodos de controles farmacopeicos para heparina (CASU; NAGGI; TORRI, 2015).

Uma década depois, infelizmente, a história se repete. Os fabricantes de heparina nos EUA, Baxter International e Hospira, relataram escassez de heparina em novembro de 2019, assim como a Pfizer na Austrália. Embora essa escassez tenha sido atribuída a distúrbios de fabricação, um surto de peste suína africana na China em agosto de 2018 adicionou mais uma ameaça ao fornecimento global de heparina para o ano de 2019 (MCCARTHY *et al.*, 2020).

O vírus da peste suína africana não prejudica os humanos, mas se espalha rapidamente entre os suínos por contato direto, exposição a superfícies contaminadas ou carrapatos. Os principais sintomas são febre alta, hemorragia interna e, muitas vezes, a morte dos animais. Além disso, pode suportar temperaturas de calor e frio e persiste por semanas nas carcaças, fezes e carne crua de animais infectados, o que aumenta seu potencial de propagação (VILANOVA; TOVAR; MOURÃO, 2019).

Em julho de 2019, um fabricante alemão de heparina, Fresenius Kabi, começou a racionar remessas de heparina para seus clientes nos EUA devido a um potencial escassez relacionada à fabricação e ao surto de peste suína africana. Em outubro de 2019, no entanto, o FDA relatou que o surto de peste suína africana na China não afetou a fabricação e distribuição de heparina no mercado dos EUA até o momento. No entanto, várias instituições nos EUA começaram a implementar

estratégias alternativas para obtenção de agentes anticoagulantes, devido à instabilidade do fornecimento da heparina (MCCARTHY *et al.*, 2020).

Verifica-se então a importância do estudo de fármacos alternativos análogos à heparina. O desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de distúrbios hemostáticos ainda é uma área de interesse significativa nas indústrias de biotecnologia e farmacêutica, visando melhorias contínuas na saúde e na qualidade de vida dos pacientes (GALE, 2011). Dentre as possíveis alternativas à heparina, destacam-se vários polissacarídeos sulfatados.

2.5 POLISSACARÍDEOS NATURALMENTE OU QUIMICAMENTE SULFATADOS COM ATVIDADE ANTICOAGULANTE

Polissacarídeos são carboidratos formados pela polimerização de monossacarídeos, que originam estruturas de grande massa molecular. Essas macromoléculas possuem múltiplos efeitos biológicos e podem ser extraídos, por exemplo, das plantas, fungos, bactérias e animais (WANG *et al.*, 2018; CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009). Muitas vezes, os polissacarídeos naturais podem apresentar pouca ou nenhuma bioatividade, entretanto, a modificação da estrutura química destes polímeros pode proporcionar melhorias na sua atividade biológica (WANG *et al.*, 2018; LIANG *et al.*, 2017). Neste sentido, a sulfatação de polissacarídeos é uma das formas de modificação química que vem ganhando destaque na literatura nas últimas duas décadas (BEDINI *et al.*, 2017; CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019).

A modificação de um polissacarídeo através da sulfatação química pode alterar significativamente as características de sua estrutura, promover e melhorar sua bioatividade e até adicionar a ele novas bioatividades (WANG *et al.*, 2018; BAE *et al.*, 2009). Assim, o estudo de polissacarídeos sulfatados está crescendo cada vez mais, uma vez que se comprovou que eles possuem uma variedade de atividades biológicas, incluindo atividades antioxidantes, antitumoral, antirradiação, antiviral, imunorreguladoras e anticoagulantes (WANG *et al.*, 2018; XU, *et al.*, 2019; BAE *et al.*, 2009).

Muitos fatores contribuem para a promoção da bioatividade dos polissacarídeos sulfatados, como a conformação da molécula, a ligação glicosídica da cadeia principal, a composição de monossacarídeos, o grau de sulfatação, a posição

de substituição pelos grupos sulfato (WANG *et al.*, 2018; XU, *et al.*, 2019), a massa molecular, entre outros (MESTECKINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

Polissacarídeos sulfatados são poliânions com grupos sulfatos presentes em sua estrutura. Os sulfatos são geralmente introduzidos nos grupos hidroxilas disponíveis no polissacarídeo. As características estruturais dos polissacarídeos sulfatados são consideravelmente diferentes de seu polissacarídeo precursor, o que pode levar a diferentes bioatividades (XU *et al.*, 2019).

As atividades anticoagulante e antitrombótica estão entre as propriedades mais amplamente estudadas dos polissacarídeos sulfatados (MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005; CIPRIANI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2018). Assim, como alternativa à heparina, muitos estudos têm apresentado a possibilidade do uso de polissacarídeos naturalmente ou quimicamente sulfatados na prevenção de distúrbios da coagulação. Foram estudados polissacarídeos de diferentes fontes como os de invertebrados marinhos (MOURÃO e PEREIRA, 1999), cogumelos (GRACHER *et al.*, 2010; ROMÁN *et al.*, 2016), gomas de exsudato (BARDDAL *et al.*, 2015) abóbora (LIANG *et al.*, 2017), pectina (CIPRIANI *et al.*, 2009; VITYAZEV *et al.*, 2010; FAN *et al.*, 2011; MAAS *et al.*, 2012; ROMÁN *et al.*, 2017), vieira japonesa (SONG *et al.*, 2019), extratos de algas marinhas vermelhas (SANTOS-FIDENCIO *et al.*, 2019; DE ARAÚJO *et al.*, 2013), algas marinhas verdes (CAO *et al.*, 2019), pepino do mar (GAO *et al.*, 2020) entre outros.

Um estudo dos polissacarídeos da planta “jucá” foi realizado pelos pesquisadores De Araujo *et al.* (2021), em que os autores isolaram, caracterizaram quimicamente a estrutura e avaliaram os efeitos dos polissacarídeos da casca do caule da *Caesalpinia (Libidibia) ferrea* no sistema hemostático. Os polissacarídeos das cascas de *C. ferrea*, contêm majoritariamente arabinose, galactose, ramnose e ácido urônico, e apresentaram propriedades anticoagulantes e antitrombóticas. *In vitro*, os polissacarídeos inibiram a via de coagulação intrínseca, analisado pelo teste de aPTT, com uma das frações conseguindo prolongar em até 3,7 vezes o aPTT. *In vivo*, os polissacarídeos inibiram (36–69%) a trombose venosa induzida por hipercoagulabilidade e estase, apresentando discreto efeito hemorrágico. Uma vez que polissacarídeos de plantas não são naturalmente sulfatados e, que neste caso não houve sulfatação química, os autores relacionaram os efeitos anticoagulantes à presença das cargas negativas dos grupos carboxílicos dos ácidos urônicos presentes nos polissacarídeos de *C. ferrea*.

Já Alban e Franz (1994) estudaram o efeito da massa molecular da goma curdlan (1→3-β-glucana) na atividade anticoagulante. Os pesquisadores realizaram a degradação térmica da glucana de alta massa molecular (>500 kg/mol), com posterior sulfatação desses derivados, que apresentaram ao final, massa molecular variando de 14 a 30 kg/mol. Os autores verificaram que quanto menor a massa molecular menor a atividade anticoagulante, mesmo as amostras apresentando o mesmo valor de grau de sulfatação. Uma vez que os curdlan sulfatados degradados termicamente mostraram diferentes atividades anticoagulantes, e que também são dependentes da massa molecular, a influência do comprimento da cadeia também foi determinada com um espectro de massa molecular mais amplo e com compostos de polidispersidade reduzida. Foram analisados os curdlan sulfatados polidispersos com grau de sulfato de 0,60 e massa molar variando de 2-380 kg/mol e também outros derivados com grau de sulfatação maior (1,20) e massa molar de 2-230 kg/mol. Ao final os autores verificaram que dentro dessa faixa de massa molecular a atividade anticoagulante resulta em uma curva com formato de sino, e que para uma inibição da formação de fibrina dependente da fator Ila é necessária uma massa molecular no mínimo maior que 30 kg/mol. Assim os autores conseguiram demonstrar a influência da massa molecular na atividade anticoagulante.

Qin *et al.* (2021) estudaram fucanas sulfatadas do pepino do mar da espécie *Stichopus herrmanni* e seus produtos despolimerizados (dFS) preparados por degradação por peróxido. A fucana sulfatada apresentou um estrutura altamente regular formada por →3)-α-L-Fucp2S-(1→. Com a degradação, os pesquisadores verificaram que a ligação glicosídica foi quebrada primeiro, e o anel do açúcar foi aberto acompanhado pela oxidação ocorrida na extremidade redutora, produzindo fragmentos de ácido 2-sulfatado-2,3-diidroxil-butanodioico distinto na extremidade redutora, sendo que outras características estruturais da fucana sulfatada permaneceram estáveis. Os autores verificam que quanto menor a massa molecular das frações analisadas, melhor é a atividade anticoagulante avaliada pelo aPTT. Além disso, as amostras também inibiram o fator Ila na presença da HCII.

YANG *et al.* (2013) estudaram quitosanas sililadas sulfatadas e a influência da otimização da sulfatação química na atividade anticoagulante do polissacarídeo. Os autores utilizaram quitosanas de massas moleculares diferentes para a reação de trimetilsililação e posteriormente sulfatação, obtendo graus de sulfatação diferentes, desde 1,65 até 2,46 e massa molecular variando de 18,1 até 54,4 kg/mol. Os impactos

da massa molecular da quitosana, a razão molar entre o agente sulfatante por unidade monossacarídica, o grau de sulfatação, a temperatura e o tempo de reação na sulfatação foram investigados. Os autores verificaram que a trimetilsililação aumentou significativamente a reatividade e solubilidade da quitosana em solvente orgânico. A atividade anticoagulante da quitosana sulfatada obtida foi dependente da dosagem de sulfato. Um alto valor no grau de sulfatação ($>2,0$) é essencial para a capacidade anticoagulante, ao passo que não houve um padrão regular entre a massa molecular e a atividade anticoagulante.

Verifica-se então estudos já disponíveis envolvendo polissacarídeos sulfatados e suas atividades anticoagulante e antitrombótica. Estudos nessa área podem colaborar ainda mais para aumentar o conhecimento sobre essas moléculas e suas potenciais aplicações como agentes anticoagulantes alternativos à heparina.

De maneira geral, a ação anticoagulante do polissacarídeo sulfatado se dá pela presença de grupos sulfatos na estrutura do polissacarídeo. O grupo sulfato possui carga negativa em uma ampla faixa de pH (4–12), e pode se ligar eletrostaticamente a biomoléculas carregadas positivamente. A atividade anticoagulante advém, então, da interação dessas cargas negativas presentes no grupo sulfato no polissacarídeo com proteínas da cascata de coagulação. Utilizando ensaios de inibição dos fatores IIa e Xa, ou ensaios de coagulação (aPTT, TT, PT), são determinadas as atividades anticoagulantes desses polissacarídeos sulfatados (CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019).

O grau de atividade depende da composição e do tipo de ligação presente no polissacarídeo, justificando porque cada polissacarídeo é capaz de formar seus próprios complexos específicos com serpinas e serinoproteases, alvos dos anticoagulantes (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

Normalmente, os polissacarídeos sulfatados interagem principalmente ionicamente através das fortes cargas negativas de seus grupos sulfato, com os resíduos de aminoácidos carregados positivamente presentes em proteínas envolvidas com a coagulação sanguínea, como a AT, e assim, exibem atividades anticoagulantes. Um alto grau de sulfatação possibilita o aumento da densidade de cargas negativas e permite que um polissacarídeo sulfatado neutralize fortemente esses resíduos de aminoácidos carregados positivamente, portanto, a atividade anticoagulante é frequentemente promovida com o aumento de grupos sulfatos na molécula (XU *et al.*, 2019). Assim, estudam-se diferentes métodos de sulfatação para

a obtenção de polissacarídeos quimicamente sulfatados, visando melhorar sua bioatividade.

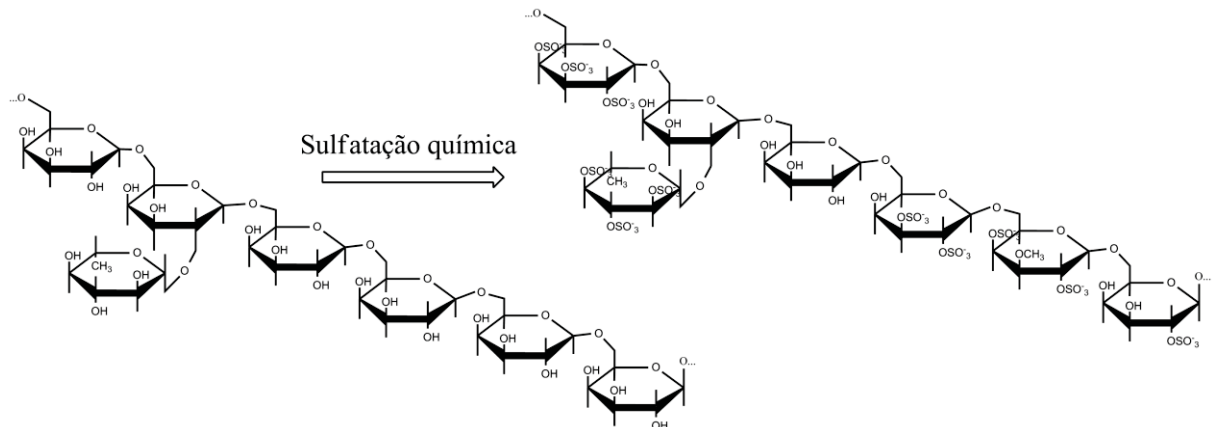
2.5.1 Métodos de sulfatação química em polissacarídeos

Nas duas últimas décadas houve um grande impulso no desenvolvimento de métodos para a sulfatação de polissacarídeos ou métodos para a modificação do padrão de sulfatação em polissacarídeos já naturalmente sulfatados, devido à grande importância que essas moléculas vêm apresentando. A sulfatação é geralmente realizada em condições não regioseletivas, proporcionando polissacarídeos que apresentam grupos sulfato distribuídos aleatoriamente ao longo de sua cadeia polimérica (BEDINI *et al.*, 2017). Entretanto, métodos enzimáticos e químicos para a inserção regioseletiva de grupos sulfato em posições específicas das unidades de repetição de polissacarídeos, bem como a modificação seletiva do padrão de sulfatação em polissacarídeos naturalmente sulfatados já vem sendo relatados (BEDINI *et al.*, 2017; DE ARAÚJO *et al.*, 2013; CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019).

Existem muitos agentes sulfatantes para realizar a sulfatação química, como por exemplo, ácido clorossulfônico; ácido clorossulfônico-piridina; ácido sulfúrico concentrado; trióxido de enxofre-piridina; ácido piperidina-*N*-sulfônico; ácido sulfâmico-piridina, dentre outros (CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019; WANG *et al.*, 2018).

O método de sulfatação desempenha um papel fundamental na obtenção de polissacarídeos sulfatados de alta bioatividade. Na sulfatação química de polissacarídeos, hidroxilas são substituídas por grupos sulfatos, o que resulta em um novo grupo ativo na estrutura dos polissacarídeos (WANG *et al.*, 2018). Os ésteres de sulfato são introduzidos no lugar das hidroxilas livres no polissacarídeo, mas ainda não há um método universal para síntese de polissacarídeos sulfatados (MESTECKINA; SCHCHERBUKHIN, 2009). A Figura 7 exemplifica a sulfatação de uma fucogalactana, mostrando a substituição dos grupos hidroxilas por grupos sulfatos neste polissacarídeo.

FIGURA 7 – SULFATAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS



FONTE: Adaptado de Román *et al.* (2017).

Assim, pesquisadores têm tentado explorar uma maneira eficaz e conveniente de preparar polissacarídeos sulfatados com melhores bioatividades. Atualmente, o método do ácido clorossulfônico-piridina, o método do ácido sulfúrico e o método do trióxido de enxofre-piridina são os métodos de sulfatação mais comuns (WANG *et al.*, 2018), sendo apresentado na Tabela 1, a comparação dos três métodos supracitados.

TABELA 1 – COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE SULFATAÇÃO MAIS COMUNS

	Método do ácido clorossulfônico-piridina	Método do ácido sulfúrico	Método do complexo trióxido de enxofre-piridina
Reagente/Solvente	Ácido clorossulfônico, piridina	Ácido sulfúrico, formamida	Trióxido de enxofre, piridina
Vantagens	Derivados sulfatados de fácil obtenção, alto grau de substituição	Fácil de operar, seguro	Alto grau de substituição, facilidade de manuseio
Desvantagens	Operação complicada, reação violenta, longo tempo de reação	Baixo grau de substituição	Alto custo

Fonte: Adaptado de Wang *et al.* (2018).

Em consideração às condições severas de reação no método do ácido clorossulfônico-piridina e o baixo grau de sulfatação no método do ácido sulfúrico, o método do complexo trióxido de enxofre-piridina se apresenta como uma excelente alternativa. A vantagem deste método é que a operação é mais conveniente, com

reações mais seguros e facilidade no manuseio dos reagentes, no entanto, os reagentes são mais caros (WANG *et al.*, 2018).

As vantagens do complexo de trióxido de enxofre inclui sua relativa estabilidade, facilidade de manuseio e compatibilidade com solventes polares, como dimetilformamida (DMF) ou dimetilacetamida (DMA), facilitando a solubilização dos polissacarídeos (CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019).

Um exemplo empregando o método do trióxido de enxofre-piridina, foi proposta por Larm *et al.* em 1979, em que fizeram a conversão do ácido algínico a um análogo da heparina. Primeiramente os pesquisadores fizeram algumas modificações químicas no ácido algínico, como redução, oxidação e aminação redutiva, para obter uma molécula similar a heparina. Posteriormente realizaram a sulfatação desse polissacarídeo modificado. Previamente à sulfatação química, este polissacarídeo modificado foi tratado com ácido acético glacial, seguida de filtração, para assim dar início à sulfatação. O polissacarídeo foi suspenso em DMF, essa suspensão agitada foi resfriada a 0 °C e o complexo de trióxido de enxofre-piridina foi adicionado. Permitiu-se à solução a atingir temperatura ambiente gradualmente e, então, ela foi agitada por mais 2 horas. Foi adicionado piridina e o polissacarídeo sulfatado foi precipitado com acetona-metanol (9:1).

Outro exemplo da utilização do método de trióxido de enxofre-piridina, foi descrito por Zhou *et al.* (2014) em que o reagente de sulfatação foi preparado dissolvendo-se trióxido de enxofre em piridina. O polissacarídeo foi dissolvido em DMF, seguido pela adição do reagente de sulfatação e subsequente agitação a 60 °C por 10 horas, seguida da adição de água deionizada. Após o resfriamento a 0° C, a mistura foi neutralizada com NaOH até pH 7-8, dialisada e liofilizada, obtendo-se ao final o polissacarídeo sulfatado.

Além do tipo de agente sulfatante empregado, os resultados da sulfatação também dependem da estrutura química do polissacarídeo, do tempo de reação, da temperatura, assim como da razão molar dos componentes da reação (MESTECHKINA; SCHCHERBUKHIN, 2010), o que torna cada polissacarídeo quimicamente sulfatado único, apresentando diferentes bioatividades.

Portanto, os métodos de sulfatação química permitem a obtenção de polissacarídeos sulfatados com bioatividades, destacando-se as atividades anticoagulante e antitrombótica, o que permite o estudo de moléculas alternativas a heparina. A pectina cítrica quimicamente sulfatada é um exemplo de polissacarídeo

sulfatado que apresentou resultados positivos para ser usada como agente anticoagulante e antitrombótico, em que pesquisadores utilizaram diferentes métodos de sulfatação química para a obtenção do polissacarídeo sulfatado e posterior análise da sua atividade anticoagulante. CIPRIANI *et al.* (2009), MAAS *et al.* (2012) e SANTANA *et al.* (2016) utilizaram o método do ácido clorossulfônico-piridina, BAE *et al.* (2009) utilizaram o método do ácido clorossulfônico (sem piridina), já HU *et al.* (2015) e ROMÁN *et al.* (2017) utilizaram o complexo trióxido de enxofre-piridina. Apesar dos estudos já relatados com a pectina cítrica, ainda verificam-se possibilidades de modificações em sua estrutura e de otimização do seu processo de sulfatação, objetivando uma molécula com um melhor desempenho anticoagulante. Além disso, para considerar uma molécula como promissora em relação à determinada aplicação, avaliações quanto à reprodutibilidade de sua obtenção e à manutenção das suas propriedades também são fundamentais.

2.5.2 Otimização da sulfatação química de polissacarídeos

Dentro da sulfatação química verificam-se diversos métodos para sua realização, variando-se os reagentes, temperatura, o modo de operação, entre outros. As condições para a obtenção de polissacarídeos sulfatados quimicamente são, geralmente, diferentes para cada estudo. Na literatura ainda há poucos estudos sobre as condições ideais de sulfatação de polissacarídeos, visando a produção de moléculas com melhores atividades biológicas.

É importante considerar que tanto as condições de reação, como o agente de sulfatação e sua razão molar, temperatura, solventes e tempo, quanto as características do polissacarídeo, como a composição, estrutura, arranjo espacial, grau de substituição, massa molecular, presença ou ausência de grupos carboxílicos, entre outros, são fatores significativos que podem proporcionar distintas moléculas com diferentes atividades anticoagulantes e antitrombóticas (OCHOA *et al.*, 2017; MESTECHKINA; SCHCHERBUKHIN, 2010).

Tanto a sulfatação química quanto a atividade biológica dependem da composição, estrutura e conformação do polissacarídeo (ROMÁN *et al.*, 2016). Dessa forma, verifica-se a necessidade de um estudo de otimização para cada polissacarídeo individualmente, pois as diferenças encontradas em cada molécula, pode requerer diferentes métodos de sulfatação, visando sua melhor performance.

Alguns estudos sobre otimização da sulfatação química de polissacarídeos já vêm sendo relatados na literatura. Um exemplo é o dos pesquisadores Nagpal *et al.* (2019), que utilizaram a Metodologia de Superfície de Resposta utilizando como design experimental Box–Behnken, um método estatístico que explora a relação entre várias variáveis, para a otimizar as condições de reação de sulfatação da goma do quiabo. A sulfatação da goma foi realizada avaliando três variáveis separadas: 1- a proporção de agente sulfatante ácido clorossulfônico em relação à piridina; 2- tempo (h) e 3- temperatura (°C). Os autores verificaram que a condição ideal da reação de sulfatação foi aquela com proporção de ácido clorossulfônico/piridina de 0,28, tempo de reação de 3,05 h e temperatura de reação de 58,74 °C. Após a sulfatação química utilizando as condições otimizadas, a molécula apresentou atividade anticoagulante e antimicrobiana, assim como mudanças em sua reologia.

Já o estudo de otimização da sulfatação química proposto por Zhang *et al.* (2012), avaliou a influência da quantidade de reagentes na sulfatação, do tempo de reação e da temperatura utilizados na sulfatação do ofiopogonpolissacarídeo (OPS) isolado de *Ophiopogon japonicus*, conhecida como grama preta ou grama-pelo-de-urso. Os resultados mostraram que a modificação da sulfatação pode aumentar significativamente a atividade antiviral do OPS. O derivado do OPS sulfatado que apresentou o melhor efeito foi obtido através da otimização da sulfatação, em que as condições ideais para esse derivado foram, a proporção de ácido clorossulfônico para piridina de 1:4, temperatura de reação de 60 °C, e tempo de reação de 2 h.

Outro estudo, proposto por Lu *et al.* (2012), avaliou as condições ideais para a sulfatação de polissacarídeos de frutos de caqui (PFC), com o método do ácido clorossulfônico-piridina. Os pesquisadores também utilizaram a Metodologia de Superfície de Resposta utilizando como design experimental Box–Behnken, para avaliar os efeitos de três variáveis: a razão dos volumes de piridina e ácido clorossulfônico; a razão de sulfato de piridina, resultante da reação entre ácido clorossulfônico e piridina, por PFC; e o tempo de reação. Os autores verificam que as condições ideais para obter o maior valor no teste de aPTT foram a proporção de volume de ácido clorossulfônico/piridina de 1:8, a proporção de volume de sulfato de piridina/PFC de 1:3,6 e o tempo de reação de 3 h. Observa-se então, que para cada estudo, foram obtidas diferentes condições de sulfatação química, para diferentes polissacarídeos.

Portanto, a modificação de polissacarídeos apresenta uma abordagem para a síntese de novas macromoléculas funcionalizadas, com melhores atividades biológicas. Embora sejam encontrados na natureza polissacarídeos com grupos sulfatos em sua estrutura, polissacarídeos sulfatados podem ser obtidos por modificação química. Assim, o estudo das melhores condições de sulfatação é relevante para a obtenção de melhores bioatividades dessas moléculas.

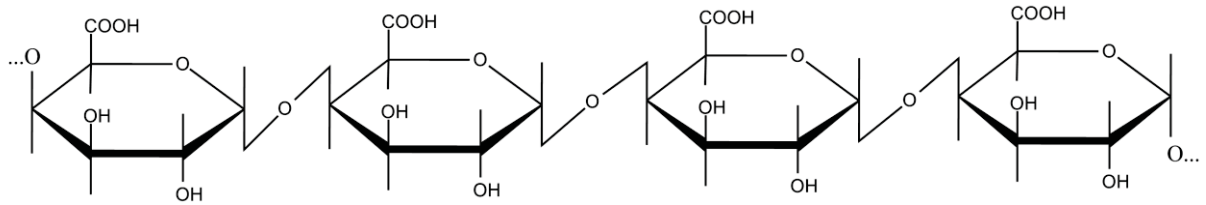
2.6 PECTINA CÍTRICA

As pectinas representam uma família de polissacarídeos que são encontrados na parede celular de plantas, e apresentam estruturas e funções versáteis (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2012; CAFFALL; MOHNEN, 2009). As pectinas são mais abundantes nas paredes celulares primárias das plantas e na lamela média (uma camada fina exterior à parede celular) (CAFFALL; MOHNEN, 2009).

As pectinas extraídas de cascas de frutas cítricas e maçãs são muito utilizadas como agente gelificante e estabilizante na indústria alimentícia e cosmética (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2012). Embora as pectinas têm sido amplamente utilizadas como agentes gelificantes em compotas e geleias, e como estabilizadores em sucos de frutas e bebidas lácteas, desde o início do século XIX, o uso de pectinas com fins farmacológicos é de interesse recente. Isto é particularmente por ser atóxica, amplamente disponível e os custos para sua produção serem relativamente baixos (SINGH *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2015). Já foram relatadas algumas bioatividades que para pectinas, como por exemplo, atividade antimicrobiana (BAE *et al.*, 2009), antioxidante (ZHU *et al.*, 2021), e antitumoral (CARRION *et al.*, 2021).

A pectina é um polissacarídeo, constituído principalmente por unidades de ácido galacturônico. Várias regiões distintas foram identificadas dentro da pectina, a principal é a homogalacturonana (HG), constituída por $\rightarrow 4$ - α -D-GalAp-(1 \rightarrow (Figura 8), podendo apresentar vários graus de metilesterificação nos grupos carboxílicos na posição 6. Além disso, pode apresentar acetil-esterificação nas posições O-2 e/ou O-3, dependendo da espécie da planta (SINGH *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2015; BAE, *et al.*, 2009; OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2012).

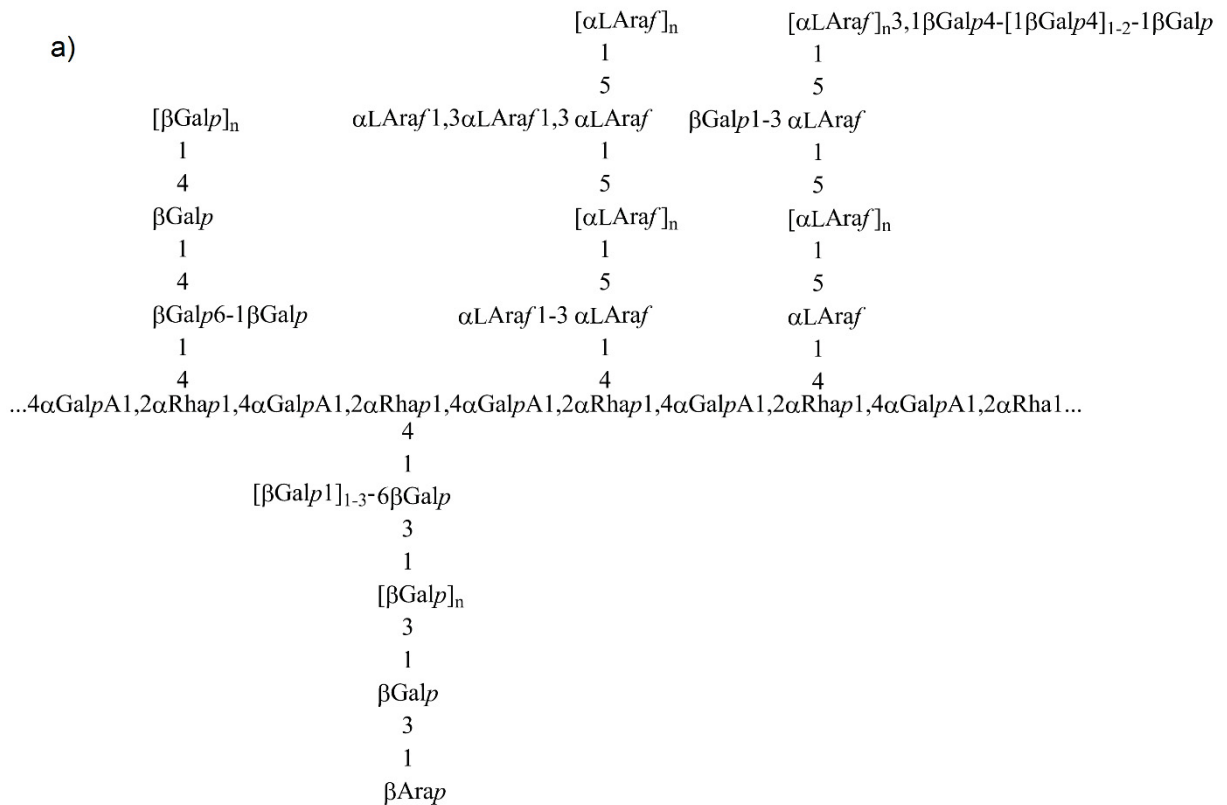
FIGURA 8 – ESTRUTURA QUÍMICA DA HOMOGALACTURONANA NÃO METILESTERIFICADA



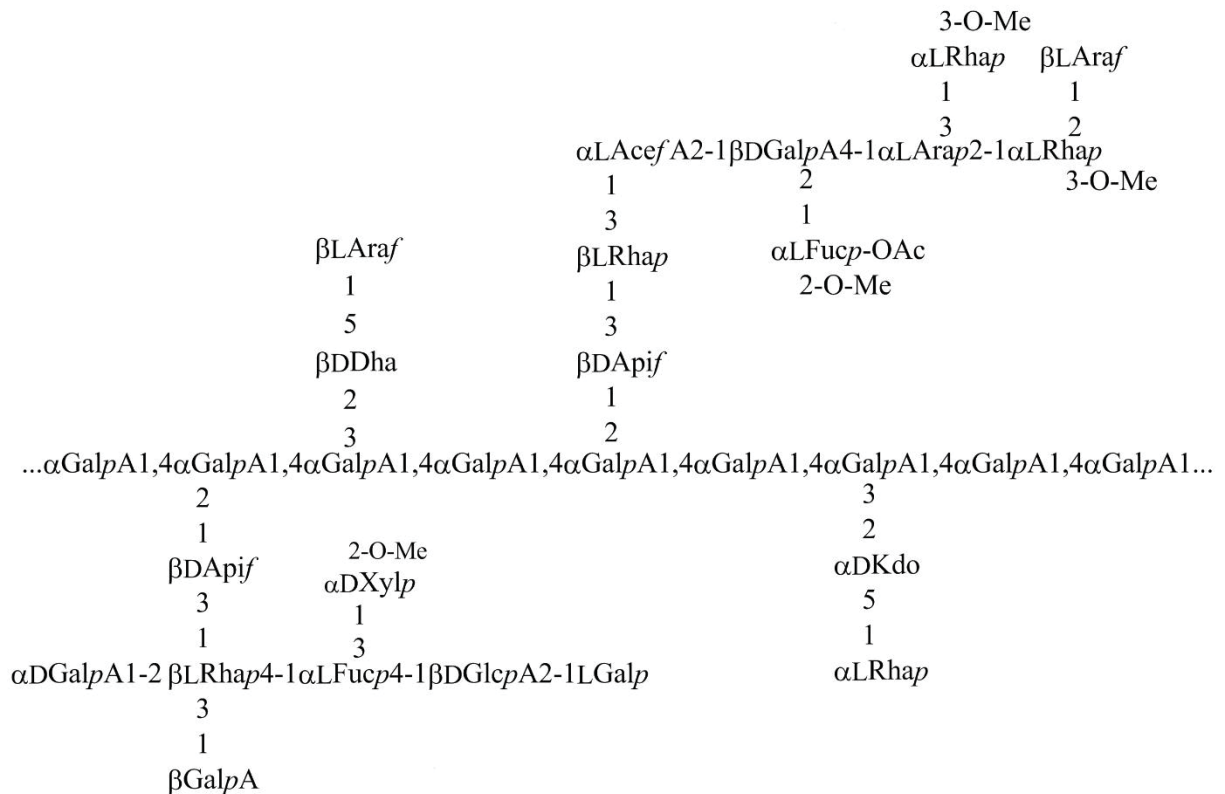
Fonte: A autora.

O ácido galacturônico (GalA) compreende aproximadamente 70% da pectina ligada nas posições O-1 e O-4 (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2012). Além da HG, também são encontrados na pectina estruturas de ramnogalacturonana do tipo I (RG-I, com unidades dissacarídicas de $\rightarrow 2$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalAp-(1 \rightarrow e ramnogalacturonana do tipo II (RG-II), a qual é composta por um esqueleto de HG com cadeias laterais complexas (SINGH *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2015; BAE *et al.*, 2009), sendo suas estruturas apresentadas na Figura 9.

FIGURA 9 – ESTRUTURAS DE RG-I (a) E RG-II (b) ENCONTRADAS EM PECTINAS



b)



Fonte: Adaptado de CAFFALL, MOHNEN (2009).

Na RG-I é muito comum encontrar ramificações de oligossacarídeos ligados à cadeia principal, compostos predominantemente por α -L-Araf e/ou por β -D-Galp (Figura 10a) (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2012). Já a RG-II (Figura 10b) é composta por um esqueleto de HG com aproximadamente sete a nove resíduos de comprimento, com cadeias laterais contendo até 12 tipos diferentes de resíduos de glicosil, incluindo por exemplo, 2-O-metil-xilose, 2-O-metil-fucose, ácido acérico, 2-ceto-3-desoxi-D-ácido-lyxoheptulosárico (Dha), e ácido 2-ceto-3-desoxi-D-manoctulosônico (Kdo) (CAFFALL; MOHNEN, 2009).

Também, xilogalacturonanas e apiogalacturonanas já foram encontradas em pectinas. Nestes casos, resíduos de xilose e apiose aparecem como substituintes da cadeia principal de HG (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2012).

A sulfatação da pectina leva este polissacarídeo a exibir atividades anticoagulantes e antitrombóticas, como já relatado em vários estudos na literatura. Um dos primeiros trabalhos relatados com a PC e sua atividade anticoagulante foi apresentada por BAE *et al.* (2009). Neste estudo os pesquisadores sulfataram através do método do ácido clorossulfônico uma PC com alto grau de metilesterificação (70%).

Os autores estudaram sua estrutura pós-sulfatação, reologia, atividade antimicrobiana e por fim sua atividade anticoagulante. Ao final verificou-se que com relação a reologia, a sulfatação deu origem a uma redução significativa da viscosidade da pectina. Além disso, o derivado de pectina sulfatado apresentou melhora nos efeitos antimicrobianos contra *Bacillus cereus* e *Vibrio fischeri*. Já a atividade anticoagulante, aumentou de forma dependente da concentração. O PT e aPTT prolongados indicam a inibição das vias de coagulação extrínseca e intrínseca, respectivamente, pela PC sulfatada. No caso do aPTT, o derivado da pectina apresentou mais de 3 min na concentração de 25–100 mg/mL (34 s para a pectina nativa). Esses resultados demonstraram que a incorporação de grupos sulfato na estrutura da pectina exerce um papel importante na melhoria de suas atividades biológicas.

A PC é um polissacarídeo bem acessível, de fácil obtenção, apresentando uma estrutura relativamente simples, o que facilita o estabelecimento de parâmetros de controle de qualidade (HU *et al.*, 2015). A reação de sulfatação convencional com este polissacarídeo era realizada, até então, com ácido clorossulfônico como agente de sulfatação, entretanto, Hu *et al.* (2015) estudaram outro método de sulfatação química para a PC, através do método de trióxido de enxofre-piridina em dimetilsulfóxido (DMSO). Nesse estudo os autores também conseguiram obter boas atividades anticoagulantes com a PC utilizando esse método, reforçando o potencial anticoagulante deste polissacarídeo.

Portanto, estudos sobre a PC quimicamente sulfatada e sua atividade anticoagulante já foram relatados. Além deste, outros estudos relacionando a estrutura-atividade anticoagulante da pectina também foram explorados. CIPRIANI *et al.* (2009) realizaram a hidrólise ácida parcial da PC, seguida de fracionamento por membranas de diálise com limites de exclusão de 2 e 6-8 kDa e, então, realizaram sulfatação química pelo método de O'NEILL (1955), que utiliza ácido clorossulfônico (ClSO₃H)-piridina como agente sulfatante. Desta forma, os pesquisadores geraram os derivados Pec-HWS (MM = 12.000 g/mol) e Pec-LWS (MM = 3.600 g/mol). PC-HWS apresentou atividades anticoagulante e antitrombótica superiores a PC-LWS, assim como, apresentou menor efeito hemorrágico em ratos. Os autores sugeriram que a diferença na atividade observada para os dois derivados sulfatados foi devido às suas diferentes massas molares, já que possuem basicamente a mesma estrutura química.

Estudos da otimização da sulfatação química com a PC ainda não foram relatados. Neste sentido, por meio da otimização do seu processo de sulfatação

poderia ser obtida uma molécula com atividade anticoagulante ainda melhor. Como exemplo, ROMÁN *et al.* (2016) realizaram um estudo de otimização da sulfatação química pelo método de O'NEILL (1955), para uma fucogalactana do cogumelo *Agaricus bisporus*. O estudo verificou que os melhores parâmetros para essa sulfatação química são a razão de $\text{ClSO}_3\text{H}/\text{OH}$ de 18 (relação molar do agente sulfatante por grupo hidroxila no polissacarídeo), V_t/p de 100 (relação do volume total de reação por peso da amostra; mL/g), e o tempo total de reação de 6 h. Com esses parâmetros obteve-se a fucogalactana quimicamente sulfatada com a melhor atividade anticoagulante, a qual também apresentou o maior grau de substituição por grupos sulfato, de 2,83. Em estudo posterior, ROMÁN *et al.* (2017) analisou a sulfatação química pelo método de LARM *et al.* (1979) com modificações, que utiliza trióxido de enxofre-piridina como agente sulfatante, para a pectina cítrica (CP14), fucogalactana (E) e uma glucana (G16). Os autores utilizaram os parâmetros de sulfatação otimizados do método de O'NEILL (1955) obtidos no estudo de 2016, obtendo as frações CP14S, ESL e G16S. Os resultados mostraram que a CP14S apresentou melhor atividade antitrombótica *in vivo* do que ESL, embora esta última tenha apresentado atividade anticoagulante levemente maior que a CP14S *in vitro*. Já a fração G16S não apresentou bons resultados anticoagulantes.

Verifica-se então a possibilidade de realizar a otimização da sulfatação química da PC pelo método de LARM *et al.* (1979), pois ainda esse processo não foi relatado na literatura com uma avaliação mais detalhada das condições de sulfatação. Apesar de ROMÁN *et al.* (2017) terem realizado a sulfatação da PC com o reagente trióxido de enxofre-piridina utilizando os parâmetros de sulfatação otimizados pelo método de O'NEILL (1955), é bem possível que esses parâmetros possam não ser os melhores para o método de LARM *et al.* (1979), pois os dois métodos utilizam reagentes de sulfatação diferentes. Além disso, quando ROMÁN *et al.* (2017) otimizaram as condições para o método de O'NEILL (1955), foi utilizada uma fucogalactana, um polissacarídeo com estrutura química diferente da PC. Portanto, os parâmetros adotados por ROMÁN *et al.* (2017) não representam, necessariamente, as melhores condições para a sulfatação química da PC.

Ademais, OCHOA *et al.* (2017), analisando a fucogalactana de *Agaricus bisporus* sulfatada por trióxido de enxofre-piridina e ClSO_3H , verificaram que para o primeiro reagente o valor de DS (dosagem de sulfato) obtido foi menor, porém a molécula apresentou maior atividade anticoagulante, mostrando que o padrão de

sulfatação é mais importante que a quantidade de sulfato. Verifica-se, então, a importância do agente sulfatante para a sulfatação química de um polissacarídeo, que pode levar a melhores padrões de sulfatação da molécula e, uma melhor atividade anticoagulante. Por isso, torna-se importante o estudo da otimização da sulfatação da PC, mudando o agente sulfatante de ClSO_3H , estudado por ROMÁN *et al.* (2016), para o SO_3 -piridina.

Além da otimização da sulfatação química, também é possível realizar outras modificações estruturais na PC, que possam melhorar a sua atividade anticoagulante. MAAS *et al.* (2012) realizaram 1 e 4 ciclos de carboxirredução na PC, gerando as frações CP-CR1 e CP-CR4, com 40% e 2% de ácido galacturônico, respectivamente. Os pesquisadores verificaram que a PC sulfatada pode conduzir a estruturas 2-O e 3-O sulfatadas e, quando realizado o processo de carboxirredução, resíduos de ácido galacturônico da PC são convertidos a galactose, que também podem ser sulfatados em O-6. A sulfatação química foi realizada pelo método de O'NEILL (1955) utilizando ClSO_3H -piridina como agente sulfatante na PC e nas duas frações carboxirreduzidas, gerando então a CP-S, CP-CR1S e CP-CR4S. A fração CP-CR4S apresentou até 91,1% da posição O-6 sulfatada, já a PC-CR1S apresentou uma porcentagem de sulfatação de 50,2% para a mesma posição. Verificou-se também o efeito positivo do grupo O-6 sulfato, já que CP-CR4S apresentou melhores desempenhos anticoagulantes e antitrombóticos do que a CP-CR1S. Os resultados indicaram, então, que a substituição de um grupo carboxila por um grupo sulfato na PC aumenta os efeitos anticoagulantes e antitrombóticos.

Em seu estudo, MAAS *et al.* (2012) realizaram a carboxirredução na PC nativa e, posteriormente, realizaram a sulfatação química. Verifica-se a possibilidade de realizar na PC já sulfatada, a carboxirredução, observando graus diferentes de carboxirredução e sua influência na atividade anticoagulante. Por exemplo, no estudo de SANTOS-FIDENCIO *et al.* (2019), os pesquisadores realizaram a oxidação seletiva de cinco carragenanas distintas (κ -, ι -, λ -, θ - e ν -carragenanas), correlacionando a estrutura dos polissacarídeos com o efeito biológico. As carragenanas oxidadas contendo diferentes padrões de sulfatação foram avaliadas com relação ao efeito dos grupos carboxila e o padrão de sulfatação na sua atividade anticoagulante. Os ensaios de atividade anticoagulante indicaram que a introdução do ácido urônico na estrutura da carragenana aumentou a atividade anticoagulante, embora ele tenha um efeito sinérgico dependente da posição dos grupos sulfatos nesses polissacarídeos. Os

autores também verificaram que a κ -carragenana parcialmente oxidada apresentou melhor efeito anticoagulante do que a totalmente oxidada. Ademais, o efeito da carboxirredução de uma PC sulfatada sobre a sua atividade anticoagulante ainda não foi estudado. Neste sentido, seria possível verificar a influência da substituição do grupo carboxílico por hidroxila para a atividade anticoagulante da molécula. Além disso, os derivados sulfatados e carboxirreduzidos de PC podem ser novamente sulfatados, avaliando a influência do grupo sulfato na posição O-6 para a atividade anticoagulante, como descrito por MAAS *et al.* (2012), mas agora utilizando parâmetros de sulfatação otimizados.

Nesse contexto, verificam-se oportunidades para uma possível otimização da estrutura da PC, de sua sulfatação e, conseqüentemente, de sua bioatividade. Ainda não foi relatado na literatura um estudo da PC com a otimização do seu processo de sulfatação pelo método LARM *et al.* (1979), avaliação de diferentes graus de carboxirredução e a presença de grupo sulfato em O-6, todos esses procedimentos realizados em uma mesma molécula. Além disso, um estudo comparativo com essas modificações estruturais na PC de alta e baixa massa molecular também ainda não foi relatado. Assim, pode ser realizado um importante estudo da estrutura-atividade da PC, identificando grupos e posições importantes para a atividade anticoagulante dos derivados de pectina.

3 JUSTIFICATIVA

Com o intuito de se obter fármacos análogos à heparina, estudos com diversos polissacarídeos sulfatados têm sido desenvolvidos, mostrando seus potenciais como agentes anticoagulantes. Dentre estes, há destaque para a pectina cítrica (PC) sulfatada, apresentando potencialidade para ser usada para este fim. Verifica-se que os métodos de obtenção, de sua sulfatação química, assim como outras modificações químicas na sua estrutura, com a finalidade de melhorar sua atividade anticoagulante têm sido objeto de pesquisa. Estudos do Grupo de Química de Carboidratos da UFPR com esta molécula já foram desenvolvidos, por exemplo, CIPRIANI *et al.* (2009), estudaram a influência da massa molecular na atividade da PC; MAAS *et al.* (2012) avaliaram a inserção de grupo sulfato em C6 na PC, realizando o processo de carboxirredução para a inserção desse grupamento, e ROMÁN *et al.* (2017) sulfataram a PC pelo método de LARM *et al.* (1979), avaliando seu desempenho. Com o intuito de dar continuidade aos trabalhos desenvolvidos pelo Grupo, verificou-se ser interessante a união dessas ideias centrais de cada trabalho, avaliando a influência destas na atividade anticoagulante da PC. Ademais, não há na literatura um método universal para sulfatação química de polissacarídeos, por isso, verifica-se quão interessante pode ser estudar a obtenção de parâmetros que levem a melhores atividades anticoagulantes, como estudado por ROMAN *et al.* (2016) para uma fucogalactana. Além disso, a investigação da influência do grupo hidroxila e carboxílico na atividade da PC também ainda não foi explorada, em seu trabalho MAAS *et al.* (2012) visou avaliar a atividade anticoagulante da PC após carboxirredução e inserção de grupo sulfato em C6. E, por fim, avaliar como todas essas modificações se comportam na PC de alta e baixa massa molecular. Portanto, este estudo pode contribuir para compreender melhor a estrutura-atividade anticoagulante da PC quimicamente sulfatada. Também, a utilização do bagaço da produção de suco de laranja para fins farmacêuticos poderia agregar valor a um resíduo muitas vezes descartável. Por conseguinte, a PC apresenta-se como uma molécula de grande interesse para estudos de bioatividade.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAL

Esta pesquisa teve como objetivo geral otimizar a atividade anticoagulante da PC, realizando a otimização da sua sulfatação química, carboxirredução e ressulfatação química, tanto para a PC de alta massa molecular, quanto para a PC de baixa massa molecular, utilizando como base os estudos de CIPRIANI *et al.* (2009), MAAS *et al.* (2012) e ROMÁN *et al.* (2016).

4.1.1 Objetivos específicos

- 1) Obter fragmentos de PC de baixa massa molecular, a partir da hidrólise ácida parcial da PC nativa;
- 2) Otimizar a atividade anticoagulante da PC de alta e baixa massa molecular, obtendo parâmetros de sulfatação, utilizando metodologia de LARM *et al.* (1979) com modificações, que levem a maiores valores de aPTT;
- 3) Avaliar a estabilidade dos derivados que apresentarem a melhor atividade anticoagulante na otimização da sulfatação química;
- 4) Submeter a PC de alta e baixa massa molecular quimicamente sulfatada a 1 e 4 ciclos de carboxirredução e avaliar a atividade anticoagulante dos derivados obtidos;
- 5) Submeter os derivados de PC de alta e baixa massa molecular quimicamente sulfatado e carboxirreduzido (com 1 e 4 ciclos de carboxirredução), a um novo ciclo de sulfatação química, utilizando os parâmetros de sulfatação já otimizados, visando a inserção de grupos sulfato na posição O-6, avaliando a atividade anticoagulante do produto obtido;
- 6) Determinar o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT) e o grau de substituição por grupos sulfato (DS) dos derivados obtidos;
- 7) Avaliar o efeito do derivado que apresentar a melhor atividade anticoagulante, tanto da PC de alta quanto de baixa massa molecular, sobre as atividades do fator IIa (α -trombina) e do fator Xa (FXa).

ARTIGO

Manuscrito a ser enviado para a revista *International Journal of Biological Macromolecules*.

Optimization of the anticoagulant activity of chemically sulfated citrus pectin

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

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Sector of Biological Sciences,
Federal University of Paraná, CP 19.046, CEP 81.531-980, Curitiba, PR, Brazil.

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

ABSTRACT

The modification of the chemical structure of natural polysaccharides can provide an improvement in their biological activity. Thus, the chemical sulfation of polysaccharides has gained notoriety, especially with regard to anticoagulant activity, as example, sulfated citrus pectin (CP), has the potential to be used for this purpose. Therefore, this research aims to optimize chemical sulfation, as well as performing carboxyl-reduction cycles in CP, in order to understand its structure-activity and obtain a molecule with better anticoagulant performance. In this study, CP was submitted to dialysis and partial acid hydrolysis to obtain high and low molecular weight CP, respectively (CPHW = 298.8 kg/mol and CPLW = 7.53 kg/mol). Aiming at products that present better anticoagulant activities, they were subjected to optimization of chemical sulfation, varying the molar ratio of sulfating agent per hydroxyl group in the polysaccharide ($\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH}$), the reaction time (h) and the total volume of the reaction per sample weight (V_t/w). The anticoagulant activity was evaluated by the ability of derivatives to increase aPTT. The high and low weight sulfated derivatives with better activity, CPHWS1 (DS = 1.41) and CPLWS1 (DS = 0.52), were obtained with $\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH} = 9, 8$ h and 4 h of reaction, respectively, and $V_t/w = 100$ mL/g. The better solubility of CPHW during the sulfation reaction seems to have contributed to a higher DS compared to CPLW. CPHWS1 and CPLWS1 were carboxyl-reduced (1 and 4 cycles; CR1 and CR4) and also subjected to a second sulfation cycle (S2). It was verified that the carboxyl groups influence the anticoagulant activity, since the carboxyl-reduced derivatives had lower activities, also associated with the fact that the carboxyl-reduction reaction led to the removal of sulfate groups from the structure. Furthermore, it is possible that the interaction of the sulfate group with the coagulation cascade proteins is more effective than the interaction of carboxylic groups, since the resulfated samples (S2) had better anticoagulant properties. In the end, the derivatives with the best anticoagulant activities were CPHWS2CR4 (aPTT at 40 $\mu\text{g/mL} = 226.2$ s; DS = 1.27) and CPLWS2CR1 (aPTT at 50 $\mu\text{g/mL} = 187.1$ s; DS = 1.30), which showed to act inhibiting FIIa and FXa without the presence of serpins, but with the effect being increased in the presence of antithrombin, especially on FIIa. The optimization of chemical sulfation and other changes made in the CPHW and CPLW have shown to influence the anticoagulant activity, enabling a better understanding of the structure-activity relationship of these CP derivatives.

Keywords: Citrus pectin. Optimization of chemical sulfation. Carboxyl-reduction. Optimization of anticoagulant activity.

1. Introduction

Natural polysaccharides may present biological activity and the degree of the bioactivity may vary according to their structural characteristics. Therefore, modifying the chemical structure of these polymers can provide an opportunity to improve their biological activities (WANG *et al.*, 2018; LIANG *et al.*, 2017). In this sense, the chemical sulfation of polysaccharides has been gaining prominence in the literature in the last two decades (BEDINI *et al.*, 2017). Thus, the study of sulfated polysaccharides is growing more and more, since they have been shown to have a variety of biological activities, including antioxidant, anti-tumor, anti-radiation, antiviral, immunoregulatory and anticoagulant (WANG *et al.*, 2018; XU, *et al.*, 2019; BAE *et al.*, 2009). Actually, anticoagulant and antithrombotic activities are among the most widely studied properties of sulfated polysaccharides (MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2018).

Anticoagulants play an important role in preventing clotting in different situations, with heparin being the most used anticoagulant in clinical medicine since 1935 (ODUAH; LINHARDT; SHARFSTEIN, 2016). However, the use of heparin and its derivatives, in general, has adverse effects, such as hemorrhage, thrombocytopenia, osteoporosis, general hypersensitivity reactions, among others (ONISH *et al.*, 2016). In addition, due to its animal origin, there is great concern about heparin contamination by pathogenic agents (MAAS *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2015).

As alternatives to heparin, many studies have shown the possibility of using polysaccharides naturally or chemically sulfated. Normally, sulfated polysaccharides interact mainly ionically through the strong negative charges of their sulfate groups with positively charged amino acid residues present in proteins involved in blood coagulation, such as antithrombin (XU *et al.*, 2019). Thus, different sulfation methods are studied to obtain chemically sulfated polysaccharides, aiming to improve their bioactivity.

Many factors contribute to the bioactivity of sulfated polysaccharides, such as conformation of the molecule, glycosidic linkages, composition of monosaccharides, degree of sulfation, the position of substitution by the sulfate groups (WANG *et al.*, 2018; XU, *et al.*, 2019), molecular weight, among others (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010). In the chemical sulfation of polysaccharides, hydroxyls can be replaced by sulfate groups, which results in a new active group in the polysaccharides (WANG *et al.*, 2018).

There are several methods for chemical sulfation, varying the reagents, temperature, the mode of operation, among others. The conditions for obtaining chemically sulfated

polysaccharides are generally different for each study. There are still few studies in the literature on the ideal conditions for polysaccharide sulfation, aiming at the production of molecules with better biological activities (ROMÁN *et al.*, 2016). The study of chemical sulfation of polysaccharides becomes one of the researches focuses, as they can provide an opportunity to improve their biological activities (WANG *et al.*, 2018). Therefore, studies in this area can collaborate even more for the potential application of sulfated polysaccharides as alternative anticoagulant agents to heparin.

Among the chemically sulphated polysaccharides, the sulphated citrus pectin, have showed great potential to be used as an anticoagulant and antithrombotic agent (CIPRIANI *et al.*, 2009; BAE *et al.*, 2009; MAAS *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2015; SANTANA *et al.*, 2016; ROMÁN *et al.*, 2017). Citrus pectin (CP) is a polysaccharide composed mainly of units of α -D-GalAp (1 \rightarrow 4)-linked. In addition to homogalacturonan, type I rhamnogalacturonan structures are also found in CP (SINGH *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2015; BAE, *et al.*, 2009; OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2012).

CP is a molecule of great interest for studies of bioactivity, since it is non-toxic, widely available, the costs for its production to be relatively low, and because of the sustainable point of view, because CP is extracted from bagasse from orange juice production (SINGH *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2015). In the literature there are no reports of studies of optimization of its chemical sulfation, and there is a small discussion about structural changes in CP correlating with its anticoagulant activity (CIPRIANI *et al.*, 2009; MAAS *et al.*, 2012). Therefore, a more detailed study of the optimization of its chemical sulfation, as well as, a study of its anticoagulant structure-activity can contribute to a better understanding of the behavior of CP. This research aimed to optimize the anticoagulant activity of CP, performing the optimization of its chemical sulfation, carboxyl-reduction and a second cycle of chemical sulfation, both for high molecular weight and for low molecular weight CP, looking for a better anticoagulant activity and correlating it with the modifications made in the CP structure.

2. Experimental

2.1 Material

Pectin from *Citrus sinensis* (L.) Osbeck was obtained commercially and was dialyzed (12-14 kDa cut-off membrane) in tap water for 48 h followed by distilled water for 24 h. The material was then concentrated using rotary evaporator and freeze dried, yielding the high molecular weight citrus pectin (CPHW; 75.9% yield). The heparin used as reference for the

biological tests was the 6th International Standard of Unfractionated Heparin (200.47 IU/mg), and the enoxaparin was from Eurofarma (Versa[®], lot number L558657A, 40 mg/0.4 mL).

2.2 Methods

2.2.1 Partial acid hydrolysis of citrus pectin

CPHW was hydrolyzed according to the method of CIPRIANI *et al.* (2009) to obtain the low molecular weight CP (CPLW). CPHW (10.0 g) was partially hydrolyzed with 1 mol/L HCl (500 mL) at 100 °C for 2 h, with subsequent centrifugation, that provided a soluble fraction, the pH of which was adjusted to 7.0 with aq. NaOH, and then concentrated in rotary evaporator. The material was then dialyzed (6-8 kDa cut-off membrane) in tap water for 48 h followed by distilled water for 24 h. The dialysis retained fraction, was then concentrated using rotary evaporator and freeze dried, obtaining CPLW, with 13.0% yield.

2.2.2 Optimization of chemical sulfation using SO₃-pyridine complex

Based on the studies by ROMÁN *et al.* (2016), CPHW and CPLW were sulfated, according to the method described by LARM *et al.* (1979), varying the molar ratio of sulfating agent to hydroxyl group on the polysaccharide (η SO₃-pyridine/OH), the reaction time (h) and the ratio of total reaction volume to sample weight (Vt/w). All the reactions were carried out at 50 °C. The molar quantity of OH groups in CPHW and CPLW was determined considering the average molecular weight of their monosaccharide units, according to the percentages of galacturonic acid and rhamnose present in its structure, determined by the monosaccharide composition. Also, the presence of two hydroxyl groups per monosaccharide unit was considered.

a) Chemical sulfation with different η SO₃-pyridine/OH: a solution containing 10 mg of the polysaccharide in 400 μ L of *N,N*-dimethylformamide, and a second solution of SO₃-pyridine complex in 600 μ L of *N,N*-dimethylformamide were prepared, with overnight stirring. The first solution was then added to the second (Vt/w = 100 mL/g, on a scale of 1 mL/0,01 g). The sulfation reaction was carried out for 6 h at 50 °C in a closed system, in molar ratios of SO₃-pyridine/OH of 1, 3, 6, 9, 12, 15, and 18. All sulfation reactions were stopped and neutralized to pH 7.0 with 10% NaHCO₃, and dialyzed (6-8 kDa cut-off membrane for CPHW and 3,5 kDa cut-of membrane for CPLW) in tap water for three days followed by distilled water for two days, concentrated using rotary evaporator and freeze dried.

b) Chemical sulfation with different reaction times: with the best ηSO_3 -pyridine/OH determined, reaction times of 2, 4, 6, 8 and 10 h were evaluated, followed the conditions described above.

c) Chemical sulfation with different Vt/w: with the best ηSO_3 -pyridine/OH and reaction time determined, Vt/w of 500, 300, 100 and 50 mL/g were evaluated, followed the conditions described above.

The optimized chemical sulfation parameters were those that led to products with the best anticoagulant activities, determined by aPTT test. These parameters were further used to obtain sulfated derivatives in large scale, resulting in CPHWS1 and CPLWS1.

2.2.3 Evaluation of the stability of the sulfated derivatives

CPHWS1 and CPLWS1, after freeze drying, were stored in desiccator at room temperature. After 6 months of storage, their anticoagulant activities were re-evaluated by aPTT test.

2.2.4 Carboxyl-reduction

Based on MAAS *et al.* (2012) with alterations, carboxyl-reduction was performed in CPHWS1 and CPLWS1, using the carbodiimide method (TAYLOR and CONRAD, 1972). Samples were dissolved in MES [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid] buffer (0.2 mol/L, pH 4.75), to which carbodiimide [cyclohexyl-3-(2-morpholino ethyl) carbodiimide] was added slowly with stirring, in a ratio of 24.0 mg carbodiimide to each 1.0 mg uronic acid in the sample. The reaction time was 2 h. TRIS (hydroxymethyl aminomethane) buffer (2 mol/L, pH 7.0) was added until the mixture reached pH 7.0 and then NaBH_4 was added to a final concentration of 2 mol/L, maintaining pH 7.0. The time for the reduction reaction was 12 h. Finally, the solutions were then dialyzed (6-8 kDa cut-off membrane for CPHWS1 and 3.5 kDa cut-off membrane for CPLWS1) in tap water for three days followed by distilled water for two days. The retained solutions were concentrated in rotary evaporator and freeze dried. CPHWS1 and CPLWS1 were subjected to 1 and 4 cycles of carboxyl-reduction, resulting in CPHWS1CR1 and CPLWS1CR1 (1 cycle), CPHWS1CR4 and CPLWS1CR4 (4 cycles).

2.2.5 Sulfation after carboxyl-reduction

The fractions CPHWS1CR1, CPLWS1CR1, CPHWS1CR4 and CPLWS1CR4 were sulfated again, according to section 2.2.2, using the optimized parameters, to insert sulfate groups at C6, generating CPHWS2CR1, CPLWS2CR1, CPHWS2CR4 and CPLWS2CR4.

The molar quantity of OH groups in these samples, to calculate the $\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH}$, was determined considering the average molecular weight of their monosaccharide units, according to the percentages of galacturonic acid, galactose and rhamnose present in its structure, after 1 and 4 carboxyl-reduction cycles. Also, the presence of hydroxyl groups per monosaccharide unit was considered according to the equation 1:

$$nt_{OH} = n_{OH} - DS \quad (\text{Equation 1})$$

Where nt_{OH} is the total number of free hydroxyl groups per monosaccharide unit considered for the second cycle of sulfation reaction; n_{OH} is the number of hydroxyl groups per monosaccharide unit after carboxyl-reduction (for 1 cycle it was considered 2.5 and for 4 cycles it was considered 3, based on the percentage of uronic acid found after the carboxyl-reduction process) and DS is the degree of substitution of sulfate groups).

2.2.6 Structural analysis of polysaccharides

2.2.6.1 Homogeneity and relative molecular weight (Mw)

The homogeneity and Mw of the polysaccharides were determined by High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC), with detection by refractive index. Four ultra-hydrogel columns in series were used, with exclusion sizes of 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 and 5×10^3 Da. The eluent was a solution containing NaNO_2 (0.1 mol/L) and NaN_3 (200 ppm), at 0.6 mL/min. Each polysaccharide was dissolved in the same solution used as eluent (1.0 mg/mL) and filtered through a 0.22 μm pore size filter prior to injection into the equipment (100 μL). The peak elution time of the polysaccharides was compared with a calibration curve obtained with standard dextrans of 487, 266, 124, 72.2, 40.2, 17.2, 9.4 and 5 kg/mol from Sigma.

2.2.6.2 Monosaccharide composition

For a qualitative analysis, silica gel 60 thin layer chromatography (TLC) was used. Polysaccharides (2.0 mg) were hydrolyzed with 1 mL of TFA (2 mol/L) at 100 °C for 8 h, with subsequent evaporation until dryness. Afterwards, the dry residue was dissolved with 200 μL of distilled water and examined. Ethyl acetate: n-propanol: acetic acid: water (4:2:2:1 v/v) was the mobile phase and orcinol-sulfuric acid the staining reagent (250 mg of orcinol in 95 mL of ethanol and 5 mL of H_2SO_4). Standards of galacturonic acid, galactose, rhamnose and arabinose were used for comparison. For quantitative analysis, gas-liquid chromatography (GLC) was used. Polysaccharides (2.0 mg) were hydrolyzed as above. The resulting monosaccharides were solubilized in 1 mL of water and reduced to alditols with 2.0 mg of NaBH_4 . After 18 h, acetic

acid was added until pH 7.0, the solution was evaporated to dryness and the resulting boric acid removed as trimethyl borate by co-evaporation with methanol. Acetylation was performed with 1.0 mL of pyridine: acetic anhydride (1:1 v/v), at room temperature for 12 h. The resulting alditol acetates were extracted with chloroform and then washed with a 5% aq. CuSO₄, in order to remove the residual pyridine. The residual water was removed by filtering the material through cotton soaked in chloroform. The alditol acetates were then analyzed by GLC (Thermo GC-trace ultra, with flame ionization detector - FID), using a DB-225 column (30 m x 0.25 mm). The temperature of analysis was 100 to 230 °C at 10 °C/min, held for 11 min (runtime of 23 min), with helium and nitrogen as carrier gas. Alditol acetates were identified by their retention times relative to alditol acetates prepared from standard monosaccharides (Sigma).

2.2.6.3 Measurement of uronic acids

Uronic acids in the polysaccharides were quantified by the *m*-hydroxybiphenyl colorimetric method (FILISSETTI-COZZI and CARPITA, 1991). In 400 µL of sample (0.1 mg/mL), 40 µL of a 4 mol/L potassium sulfamic acid-sulfamate solution (pH 1.6) and 2.4 mL of sodium tetraborate solution (75 mmol/L in H₂SO₄) were added, followed by vortex homogenization. The solution was heated in a boiling water bath for 20 min, with subsequent cooling in an ice bath. Then, 80 µL of 0.15% *m*-hydroxybiphenyl (w/v, in 0.5% aq. NaOH w/v) were added. After vortexing, the appearance of pink color was observed, which was read at 525 nm using microplate reader. The results were compared with a calibration curve of galacturonic acid.

2.2.6.4 NMR spectroscopy

NMR-1D and 2D spectra (¹³C, ¹H and HSQC) were obtained in BRUKER spectrometers of 9.6 T or 14.1 T, with the core operating frequency of ¹H of 400 MHz and 600 MHz, respectively. The samples were dissolved in D₂O and analyzed at 70 °C. Acetone at δ 30.2/2.22 ppm (¹³C/¹H) was the internal reference. The ¹³C/¹H correlations were assigned based on literature data (CIPRIANI *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2017; TAMIELLO-ROSA *et al.*, 2019; NASCIMENTO, IACOMINI, CORDEIRO, 2017; CANTU-JUNGLES *et al.*, 2017).

2.2.6.5 Degree of substitution of sulfate groups (DS)

The sulfate released from the sulfated polysaccharides after acid hydrolysis (1 mol/L HCl at 100 °C for 5 h) was quantified by the turbidimetric BaCl₂-gelatin method (DODGSON

and PRICE, 1962). Inorganic Na₂SO₄ was used as a standard and the percentage of sulfur (S%) in the sulfated polysaccharides was calculated from the sulfate content. DS was measured according to equation 2 (WHISTLER and SPENCER, 1964), where M_m is the weighted mean of molecular weights of the monosaccharides in the polysaccharide and M_s is the molecular weight of the sulfur.

$$DS = \frac{(M_m \cdot S\%)}{(100 \cdot M_s - 102 \cdot S\%)} \quad (\text{Equation 2})$$

2.2.7 Anticoagulant activity

2.2.7.1 aPTT test

The activated partial thromboplastin time (aPTT) was determined with an aPTT-SP Hemosil® kit (Instrumentation Laboratory Company – Bedford, MA, USA), in a KL340 Coagulation Analyzer. Citrated human plasma (50 µL) was incubated with positive control (unfractionated heparin or enoxaparin), negative control (saline) or polysaccharides at different concentrations (50 µL), at 37 °C. After 60 s, aPTT reagent was added (50 µL) and incubated for 150 s. Finally, 25 mmol/L CaCl₂ (50 µL) was added and the clotting time measured (maximum time = 300 s). For each test (n=4), mean ± standard deviation (SD) was determined.

2.2.7.2 α-Thrombin and factor Xa activities

The analyses were performed in 96-well plates, by adding 25 µL of each reaction component (vehicle = 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 components 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 µg/mL for positive control (unfractionated heparin and enoxaparin) and 0.01, 0.1, 1 and 10 µg/mL of sulfated polysaccharides. Sulfated polysaccharide, serpins (AT or HCII), and enzymes (added last; 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 OCHOA *et al.* (2017), which represents the initial velocity of reaction. For each test, the enzymes residual activity, mean ± standard deviation (SD) was

determined ($n = 3$). Analyses without serpins were also performed. In the absence of sulfated polysaccharides and serpins, the enzymes activities were considered 100%.

2.3 Statistical analysis

Results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD), and the statistical significance of the results was determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey's test. The data were considered statistically different at a significance level of $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 6[®] program, version 6.01.

3. Results and discussion

3.1 Partial acid hydrolysis of citrus pectin

Commercial CP (150 g) was dialyzed for the removal of low molecular weight compounds that come from its industrial production, such as sucrose, obtaining 113.8 g, which is equivalent to 75.9% yield. The dialyzed CP, now named CPHW (CP of high molecular weight) was subjected to partial acid hydrolysis, obtaining CP of low molecular weight (CPLW). This process started with 10 g and at the end 1.3 g of hydrolyzed fraction were obtained, corresponding to 13% yield.

HPSEC analyzes of CPHW and CPLW (Figure 1) showed that these fractions present homogeneous elution profiles, with the presence of only one peak. The relative molecular weight found for CPHW and CPLW were 298.8×10^3 g/mol and 7.5×10^3 g/mol, respectively. The efficiency of partial acid hydrolysis was verified, since it was possible to obtain a derivative (CPLW) with a molecular weight about 40 times smaller than that of CPHW.

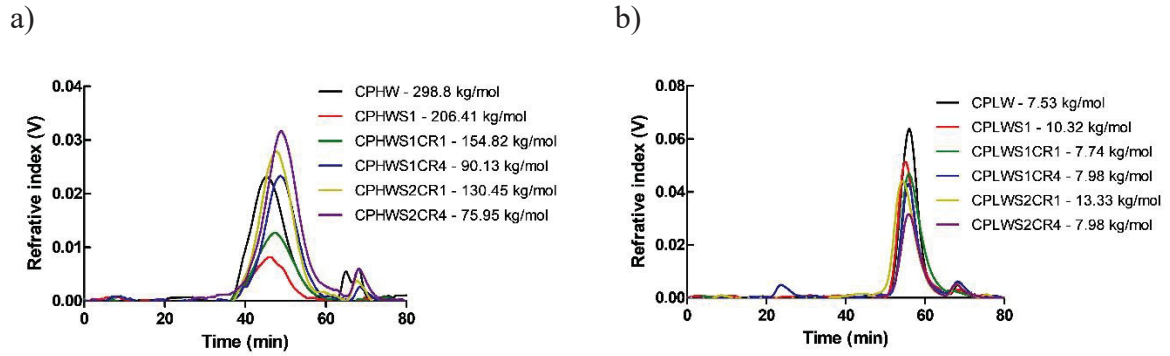


Figure 1. HPSEC elution profiles of derivatives of CPHW (a) and CPLW (b).

Analysis of monosaccharide composition and dosage of uronic acids were performed for CPHW and CPLW (Table 1). There is a large amount of galacturonic acid in both samples, consistent with the presence of homogalacturonan, which is in accordance with the literature for citrus pectins (CIPRIANI *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2015; MAAS *et al.*, 2012; ROMÁN *et al.*, 2017). Among neutral monosaccharides, in CPHW there is a greater amount of galactose, which can form part of galactans side chains (CAFFAL and MOHNEN, 2009). After partial acid hydrolysis, this galactose was removed, which is common, since glycosidic bonds between neutral monosaccharides are more susceptible to hydrolysis than those involving uronic acids (LIU *et al.*, 2021; ADAMS, 1965a; ADAMS, 1965b). In CPLW, however, there is a greater amount of rhamnose, which suggest the presence of segments of type I rhamnogalacturonans within the pectin structure. Thus, after partial acid hydrolysis, segments of galacturonic acid containing approximately 5% of rhamnose were preserved in CPLW.

Table 1. Monosaccharide composition of CPHW and CPLW.

Monosaccharide composition	CPHW (%)	CPLW (%)
Rha	0.62	5.30
Fuc	0.03	1.03
Ara	0.60	1.03
Xil	0.67	3.15
Man	0.06	-
Gal	2.79	0.47
Glu	1.22	-
Total neutral	5.99	10.98
GalA *	94.01	89.02

* Determined spectrophotometrically according to FILISETTI-COZZI and CARPITA (1991) in a separate experiment.

^1H - ^{13}C -HSQC analysis were also performed for both CPHW (Figures 2a) and CPLW (Figures 2b). Table 2 contains the assignments of the $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ correlations obtained in the HSQC analysis of the samples.

Table 2. ^1H - ^{13}C -HSQC chemical shifts of CPHW and CPLW expressed as δ (ppm).

CPHW						
Monosaccharide	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
$\rightarrow 4$)- α -D-GalAp-(1 \rightarrow	99.0/5.13	68.3/3.79	68.3/3.99	78.0/4.48	70.3/4.88	-
$\rightarrow 4$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow	104.0/4.66	71.0/3.59	73.6/3.75	77.3/4.20	-	60.5/3.83
$\rightarrow 2$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow	-	-	-	-	-	16.3/1.29
$\rightarrow 2,4$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow	-	-	-	-	-	16.7/1.35
CPLW						
$\rightarrow 4$)- α -D-GalAp-(1 \rightarrow	99.0/5.13	68.4/3.80	68.9/4.03	78.0/4.48	71.3/4.73	-
$\rightarrow 2$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow	98.4/5.31	76.4/4.15	70.0/4.14	72.0/3.44	69.0/3.95	16.5/1.29
$\rightarrow 2,4$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow	-	-	70.6/4.33	-	-	16.7/1.33

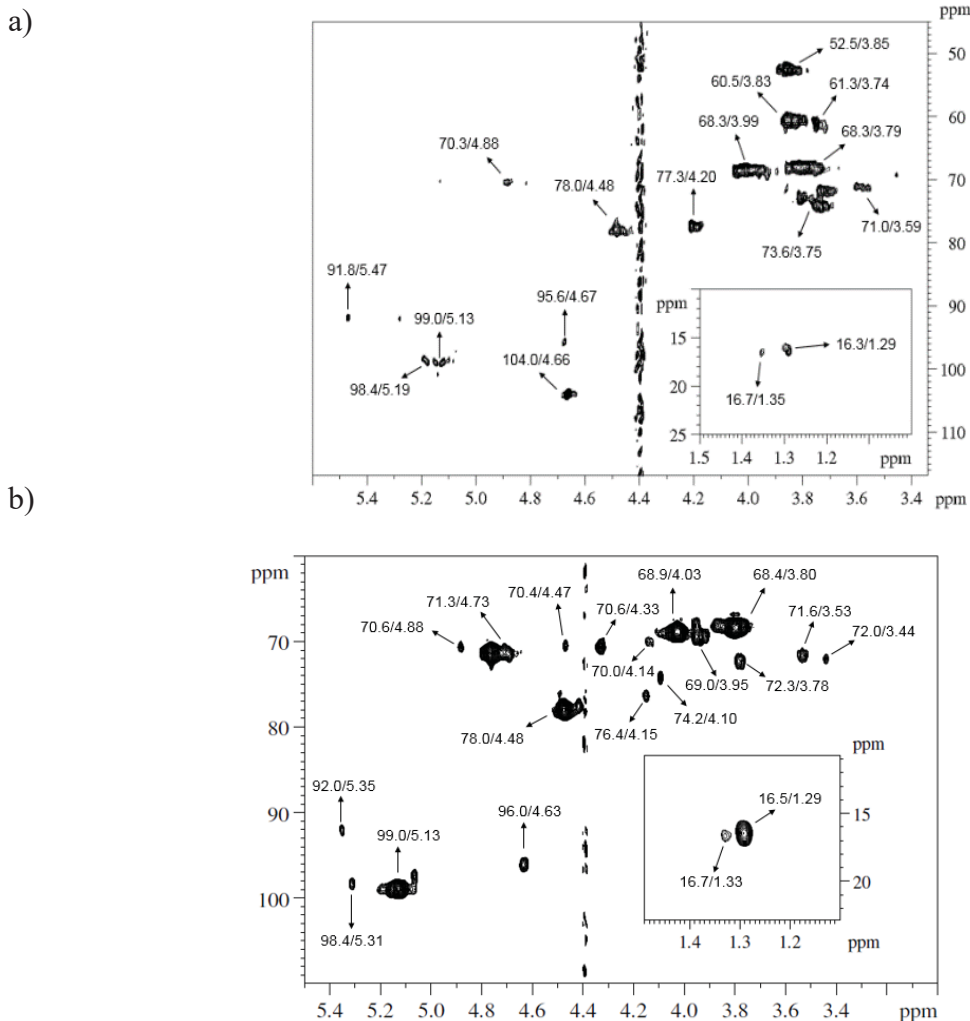


Figure 2. ^1H - ^{13}C -HSQC analyses of CPHW (a) and CPLW (b).

In addition to the correlations highlighted in Table 2, the $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ correlations in δ 95.6/4.67 ppm and δ 91.8/5.47 ppm, corresponding to β and α reducing terminals of D-GalAp, respectively, were also verified in CPHW. Also, the correlation at δ 52.5/3.85 ppm, of $-\text{CO}_2-\underline{\text{CH}_3}$, indicates the existence of $\rightarrow 4)-6-O\text{-Me-}\alpha\text{-D-GalAp-(1}\rightarrow$ in CPHW. In CPLW, the correlations in δ 96.0/4.63 ppm and δ 92.0/5.35 ppm of β and α reducing terminals of D-GalAp were more intense, which is in line with their lower molecular weight. Also, in this sample, the characteristic correlations of rhamnose are more intense and the correlations of galactose are not present, corroborating with the monosaccharide composition analysis. For CPLW, the correlation of $-\text{CO}_2-\underline{\text{CH}_3}$ was also not observed, indicating that partial acid hydrolysis removed the methyl- esters present in the CPHW.

The structural characterization of the samples, indicated that they correspond to the expected citrus pectin, being appropriate for sulfation and evaluation of anticoagulant prosperities.

3.2 Optimization of chemical sulfation

In order to obtain a better anticoagulant activity for chemically sulfated CP, a study of the effects of changes in CP sulfation parameters was carried out. CPHW and CPLW were sulfated under different conditions, considering: the molar ratio of sulfating agent to hydroxyl group on the polysaccharide ($\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH}$), the reaction time (h) and the ratio of total reaction volume to sample weight (Vt/w). The response factor was the anticoagulant activity determined by aPTT analysis, which evaluate the intrinsic pathway of blood coagulation (RABER, 1990). DS of the sulfated derivatives was also determined in order to know its effect on the anticoagulant activity.

3.2.1 Chemical sulfation of CPHW

The results of the chemical sulfation of CPHW are shown in Table 3. Analyzing the $\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH}$, keeping the reaction time of 6 h and Vt/w of 100 mL/g, it was verified that there was no statistical difference in the anticoagulant activities between the sulfated derivatives obtained with $\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH}$ of 6, 9, 12 and 18, when they were tested at 100 $\mu\text{g/mL}$ on aPTT. Moreover, reactions with $\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH}$ of 1 and 3 did not result in sulfated derivatives with anticoagulant activity (Table 3, line A). Another aPTT analysis was carried out for the sulfated derivatives obtained with $\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH}$ of 6, 9, 12 and 18, varying their

concentrations from 10 to 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3a). Now, the sulfated derivative obtained with ηSO_3 -pyridine/OH of 9 showed the best anticoagulant activity, being about 2.5 times more potent than those obtained with ηSO_3 -pyridine/OH of 12 and 18, when compared the slopes of the linear equations (Figure 3a), and 1.7 times more potent than that obtained with ηSO_3 -pyridine/OH of 6.

After, influence of reaction time on chemical sulfation of CPHW was analyzed, keeping the ηSO_3 -pyridine/OH of 9 and Vt/w of 100 mL/g. A reaction time of at least 6 h was necessary to give a sulfated derivative with high anticoagulant activity at 100 $\mu\text{g/mL}$ (Table 3, line B). When aPTT analysis was carried out with sulfated derivatives from 10 to 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3b), 8 h reaction proved to be the best condition, resulting in an anticoagulant activity 4.1 and 1.6 times higher than those obtained with 6 and 10 h reaction, respectively, when compared the slopes of the linear equations (Figure 3b).

Finally, the Vt/w was evaluated, keeping the ηSO_3 -pyridine/OH of 9 and reaction time of 8 h. Vt/w of 50 and 100 mL/g gave sulfated derivatives with high anticoagulant activity at 100 $\mu\text{g/mL}$. Moreover, it was demonstrated that higher dilutions are not suitable for chemical sulfation of CPHW (Table 3, line C). When aPTT analysis was carried out with sulfated derivatives from 10 to 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3c), Vt/w of 100 mL/g proved to be the best condition, resulting in an anticoagulant activity 2.8 times more potent than that obtained with Vt/w of 50 mL/g. Probably, the Vt/w of 100 mL/g allows a better homogenization of the reagents and consequently a better reaction.

Table 3. Optimization of chemical sulfation of CPHW monitored via anticoagulant activity determined by aPTT analysis of citrated human plasma.

Molar ratio ¹		1	3	6	9	12	15	18	Blank ⁴
A	aPTT (s) ²	37.9±0.6	38.4±0.7	>300±0.0	>300±0.0	>300±0.0	128.8±1.2	>300±0.0	36.6±0.4
	DS	0.37	0.44	1.06	0.91	0.93	1.23	1.01	-
Time (h)		2	4	6	8	10	Blank ⁴		
B	aPTT (s) ²	103.3±2.6	122.7±12.1	>300±0.0	>300±0.0	>300±0.0	36.5±1.4		
	DS	0.75	0.85	1.17	1.06	1.29	-		
Vt/w (mL/g) ³		50	100	300	500	Blank ⁴			
C	aPTT (s) ²	>300±0.0	>300±0.0	37.7±0.1	30.6±1.4	31.5±2.0			
	DS	1.01	1.30	0.31	0.21	-			

A) Reaction time = 6 h and Vt/w = 100 mL/g, at 50 °C.

B) ηSO_3 -pyridine/OH = 9 and Vt/w = 100 mL/g, at 50 °C.

C) ηSO_3 -pyridine/OH = 9 and reaction time = 8 h, at 50 °C.

¹ Molar ratio of sulfating agent to hydroxyl group on the polysaccharide (ηSO_3 -pyridine/OH).

² Samples were tested at 100 $\mu\text{g/mL}$ (final concentration, considering the volumes of plasma + sample).

³ Ratio of total reaction volume to sample weight.

⁴ Negative control (saline).

Results expressed as mean \pm SD (n = 4).

All samples were tested at concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$.

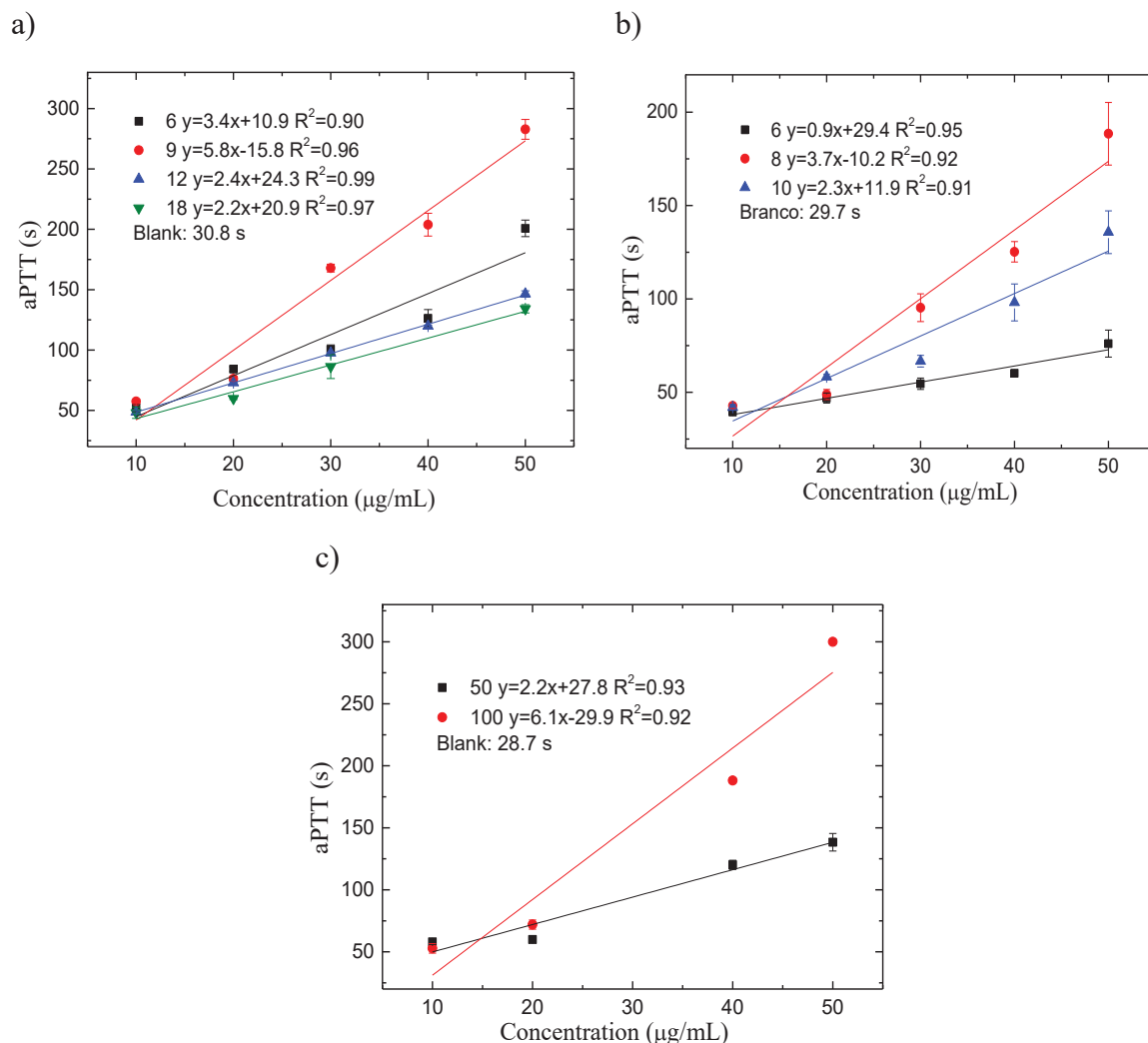


Figure 3. Optimization of chemical sulfation of CPHW monitored via anticoagulant activity determined by aPTT analysis of citrated human plasma a) Evaluation of ηSO_3 -pyridine/OH of 6, 9, 12 and 18, reaction time = 6 h and $V_t/w = 100 \text{ mL/g}$, at 50°C ; b) Evaluation of reaction time of 6, 8 and 10 h, ηSO_3 -pyridine/OH = 9 and $V_t/w = 100 \text{ mL/g}$, at 50°C ; c) Evaluation of V_t/w of 100 and 50 mL/g , ηSO_3 -pyridine/OH = 9 and reaction time = 8 h, at 50°C . Results expressed as mean \pm SD (n = 4).

In general, the sulfated derivatives of CPHW that showed high anticoagulant activities had DS close to 1.00, which corresponds, on average, to the presence of one sulfate group per monosaccharide unit of the polysaccharide. However, the sulfated derivatives obtained with ηSO_3 -pyridine/OH of 9 (DS = 0.91; Table 3, line A) and reaction time of 8 h (DS = 1.06; Table 3, line B) did not have the highest DS values in the range of parameters which were analyzed, but even so, they showed the best anticoagulant activities when tested at 10 to 50 $\mu\text{g/mL}$ on aPTT (Figure 3a and 3b). This indicates that the anticoagulant activity does not always depend on the increase in DS, and the position where the sulfate group is attached on the structure is

more important than its amount (SANTOS-FIDENCIO *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2005; MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010; MELO *et al.*, 2004; POMIN, 2009).

3.2.2 Chemical sulfation of CPLW

The results of the chemical sulfation of CPLW are shown in Table 4. Analyzing the ηSO_3 -pyridine/OH, keeping the reaction time of 6 h and Vt/w of 100 mL/g, it was verified that there was no statistical difference in the anticoagulant activities between the sulfated derivatives obtained with ηSO_3 -pyridine/OH of 9 and 12, and ηSO_3 -pyridine/OH of 12 and 18, when they were tested at 100 $\mu\text{g/mL}$ on aPTT. Moreover, for CPLW exhibit anticoagulant activity was necessary a minimum of ηSO_3 -pyridine/OH of 6 (Table 4, line A). As there was no statistical difference between the molar ratios of 9 and 12, and aiming for parameters that use less reagents in the reaction, for a better cost/benefit, it was decided to follow the studies with the ηSO_3 -pyridine/OH of 9. After, the reaction time was analyzed, keeping the ηSO_3 -pyridine/OH of 9 and Vt/w of 100 mL/g (Table 4, line B). It was verified that there was no statistical difference in the anticoagulant activities between the sulfated derivatives obtained with reaction times of 4, 8 and 10 h. Thus, in order to obtain optimized reactions that consumes less time, the reaction time of 4 h was defined as the best condition. Finally, the Vt/w was evaluated, keeping the ηSO_3 -pyridine/OH of 9 and reaction time of 4 h (Table 4, line C). The Vt/w of 100 mL/g was the best condition, which probably gives the best conditions of dilution and homogenization for the reagents.

Table 4. Optimization of chemical sulfation of CPLW monitored via anticoagulant activity determined by aPTT analysis of citrated human plasma.

Molar ratio ¹		1	3	6	9	12	15	18	Blank ⁴
A	aPTT (s) ²	31.6±0.5	31.1±0.4	73.6±2.2	81.9±1.4	84.8±5.6	75.8±0.3	90.4±0.9	30.4±0.7
				a,d	b,c,d	c,b,d,e	d,a,b,c	e,c	
	DS	0.32	0.32	0.45	0.72	0.66	1.51	0.72	-
Time (h)		2	4	6	8	10	Blank ⁴		
B	aPTT (s) ²	75.6±8.6	98.5±1.2	79.3±14.4	103.3±8.2	90.8±0.9	36.5±1.4		
		a,c,e	b,c,d,e	c,a,b,e	d,b,e	e,a,b,c,d			
	DS	0.54	0.51	0.51	0.70	0.63			-
Vt/w (mL/g) ³		50	100	300	500	Blank ⁴			
C	aPTT (s) ²	66.9±1.8	97.9±2.5	78.2±1.9	74.6±0.7	29.1±1.3			
		A	B	c,d	d,c				
	DS	0.65	0.48	0.57	0.57				-

A) Reaction time = 6 h and Vt/w = 100 mL/g, at 50 °C.

B) ηSO_3 -pyridine/OH = 9 and Vt/w = 100 mL/g, at 50 °C.

C) $\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH} = 9$ and reaction time = 4 h, at 50 °C.

¹ Molar ratio of sulfating agent to hydroxyl group on the polysaccharide ($\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH}$).

² Samples were tested at 100 $\mu\text{g/mL}$ (final concentration, considering the volumes of plasma + sample).

³ Ratio of total reaction volume to sample weight.

⁴ Negative control (saline).

Results expressed as mean \pm SD (n = 4). a,b,c,d,e are the statistical analysis.

All samples were tested at concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$.

The DS values did not follow a pattern (Table 4). Increasing $\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH}$ there is a trend of higher DS values, however, this was not shown to be a contributing factor for anticoagulant activity when reaction time and Vt/w were evaluated. Samples that had the highest DS values did not exhibit the highest aPTT values. This indicates that the amount of sulfate in the sulfated derivatives of CPLW is not directly related to the anticoagulant potency, and that the position where the sulfate groups enter in the structure exerts greater influence on the bioactivity, probably improving interactions of the derivatives with coagulation factors (ROMÁN *et al.*, 2016; SANTOS-FIDENCIO *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2005; POMIN, 2009).

In the study of the chemical sulfation of both CPHW and CPLW was found that the $\text{SO}_3\text{-pyridine/OH}$, reaction time, and Vt/w influence the final result of anticoagulant activity of the sulfated derivatives. This shows the importance of studying the optimization of chemical sulfation, and how it is relevant to better explore the performance of the resulting sulfated derivatives. Studies about optimization of chemical sulfation of different polysaccharides, such as that from *Abelmoschus esculentus* (NAGPAL *et al.*, 2019), *Ophiopogon japonicus* (ZHANG *et al.*, 2012), *Diospyros kaki* L. (LU *et al.*, 2012), and *Agaricus bisporus* (Román *et al.*, 2016), resulted in better bioactivities. Thus, individual studies of chemical sulfation for each type of polysaccharide, selecting and optimizing the reaction conditions, are important.

3.2.3 Obtaining CPHWS1 and CPLWS1

After optimizing the chemical sulfation process of CPHW ($\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH} = 9$, reaction time = 8 h, $Vt/w = 100 \text{ mL/g}$) and CPLW ($\eta\text{SO}_3\text{-pyridine/OH} = 9$, reaction time = 4 h, $Vt/w = 100 \text{ mL/g}$), their sulfated derivatives were produced in large scale, to continue the study. From 400.9 mg of each CPHW and CPLW, were obtained 695.2 mg and 399.2 mg of the sulfated derivatives CPHWS1 and CPLWS1, respectively, corresponding to yields of 173,4% and 99,6%. The reactions were performed at 50 °C for better solubility of the samples.

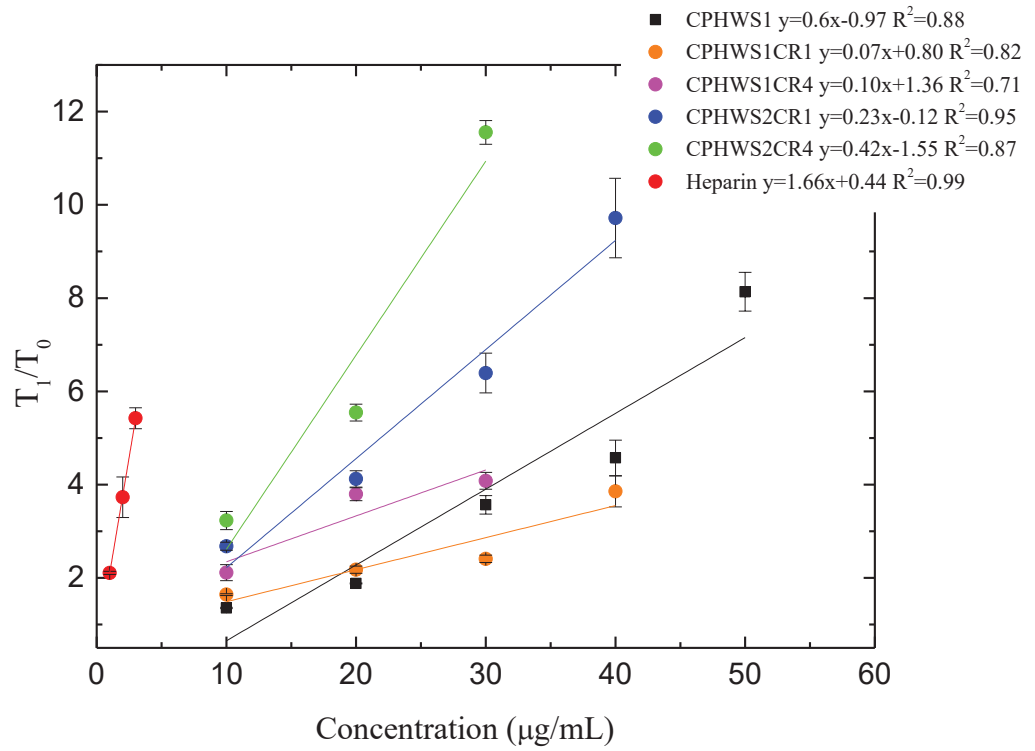
Through HPSEC analysis (Figure 1a and 1b), the relative molecular weight found for CPHWS1 and CPLWS1 were $206.41 \times 10^3 \text{ g/mol}$ and $10.32 \times 10^3 \text{ g/mol}$, respectively. There was a decrease in the Mw of CPHWS1 in comparison with CPHW, which can be related to

hydrolytic degradation of the polysaccharide during sulfation reaction. Although CPHW and CPLW have practically the same structure, which is formed mainly of α -D-GalAp (1 \rightarrow 4)-linked, there seem to be points more susceptible to hydrolysis in CPHW, contributing to reduce its Mw after chemical sulfation. However, for CPLWS1 there was an increase in the Mw in comparison with CPLW, which can be related to the addition of the sulfate groups in the polysaccharide and to the absence of hydrolytic degradation. As CPLW was previously obtained by a process of partial acid hydrolysis previously, it probably has less labile points for cleavage in comparison with CPHW.

The anticoagulant activities of CPHWS1 and CPLWS1 were evaluated (Figure 4a and 4b). According to the slopes of the linear equations, the anticoagulant activity of CPHWS1 was 30 times higher than that of CPLWS1. Similarly, the anticoagulant activity of heparin was 6.9 higher than that of enoxaparin, which is in accordance with the fact that low molecular weight structures have lower anticoagulant performances (ONISH *et al.*, 2016; OLSON *et al.*, 2010). When the same class of polysaccharide is evaluated, the anticoagulant activity is influenced by the molecular weight and the charge density distribution along the chain (MESTECHKINA; SCHCHERBUKHIN, 2010; MELO *et al.*, 2004). Cipriani *et al.* (2009) also verified this phenomenon with chemically sulfated citrus pectin of high and low molecular weight.

DS of CPHWS1 (1.41) is much higher than that of CPLWS1 (0.52). As both have basically the same structure, which could be influencing the DS would be the solubility of the samples. In CPHW, the presence of methyl groups can increase its solubility in *N,N*-dimethylformamide, improving the chemical sulfation reaction.

a)



b)

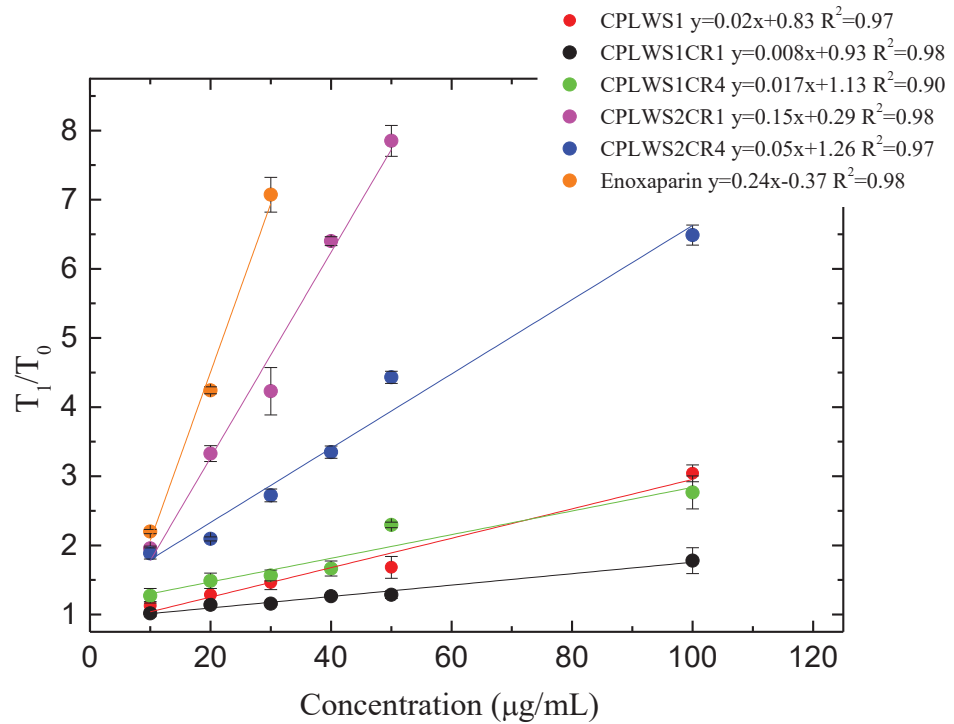


Figure 4. Effect curve of derivatives of CPHW (a) and CPLW (b) on aPTT of citrated human plasma. T_0 = aPTT in the absence of polysaccharide (negative control = saline); T_1 = aPTT in the presence of polysaccharide. Results expressed as mean \pm SD ($n = 4$).

Comparison of HSQC analyses of CPHW and CPHWS1 (Figure 5a) showed displacements of C2/H2 (δ 68.3/3.79 ppm) and C3/H3 (δ 68.3/3.99 ppm) correlations of CPHW to δ 73.7/4.40 in CPHWS1, indicating sulfation at O-2 and/or O-3 positions. For CPLW and CPLWS1 (Figure 5b), correlations at δ 68.4/3.80 ppm (C2/H2) and δ 68.9/4.03 ppm (C3/H3) of CPLW shifted to δ 72.6/4.66 ppm in CPLWS1, suggesting sulfation at O-2 and/or O-3 positions, however, there is still correlations nearly at δ 68.4/3.80 ppm (C2/H2) and δ 68.9/4.03 ppm (C3/H3) in CPLWS1, indicating presence of unsulfated O-2 and O-3 positions. These results are in agreement with the DS values of CPHWS1 (1.41) and CPLWS1 (0.52). Since CPHW and CPLW are basically constituted by $\rightarrow 4$ - α -D-GalAp-(1 \rightarrow) units, their O-4 and O-6 positions are unavailable for sulfation, having only the O-2 and O-3 positions available.

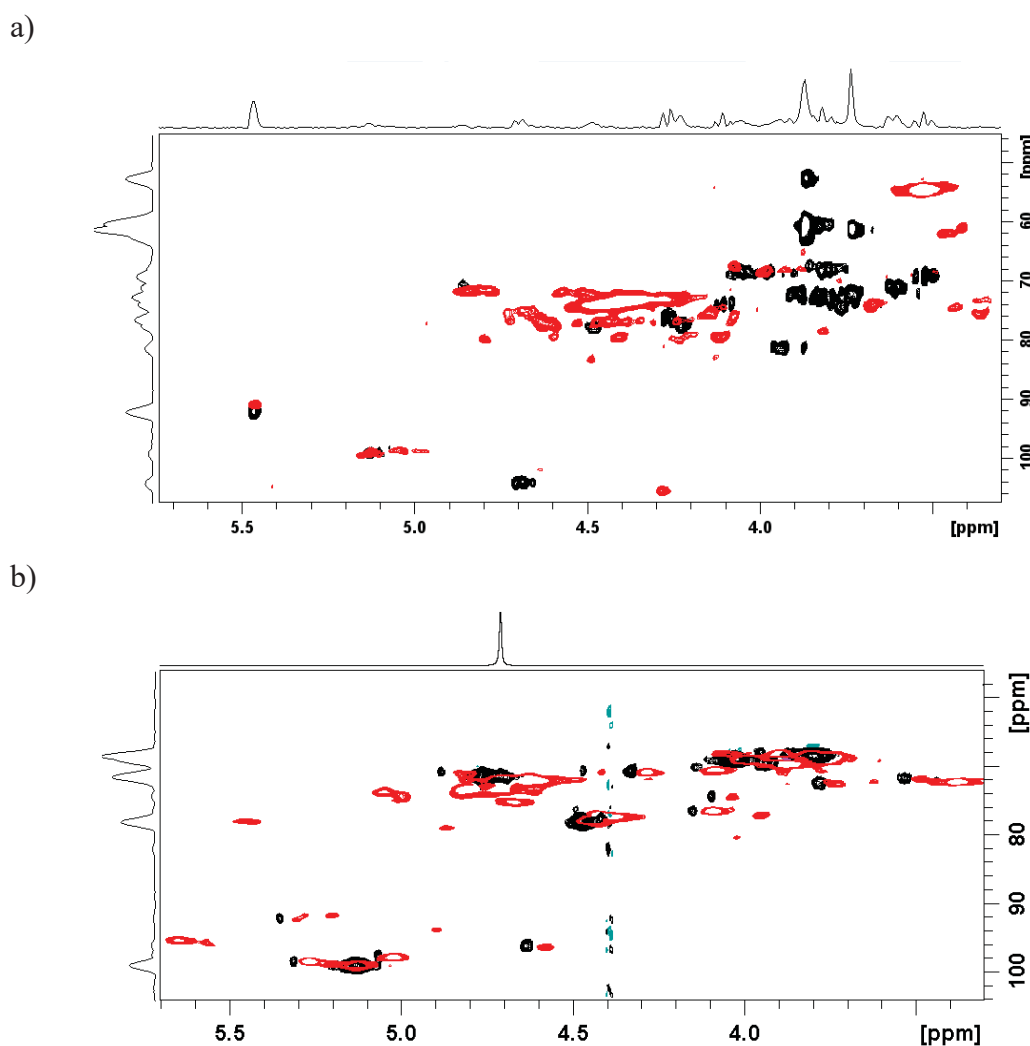


Figure 5. HSQC analyses of CPHWS1 (red) and CPHW (black) (a), and CPLWS1 (red) and CPLW (black) (b).

3.2.3.1 Evaluation of the stability of the sulfated derivatives

Both CPHWS1 and CPLWS1 were stored for 6 months, in desiccator at room temperature, to assess the stability of their anticoagulant activity during this period. After this time, aPTT analysis was performed again (Figure 6).

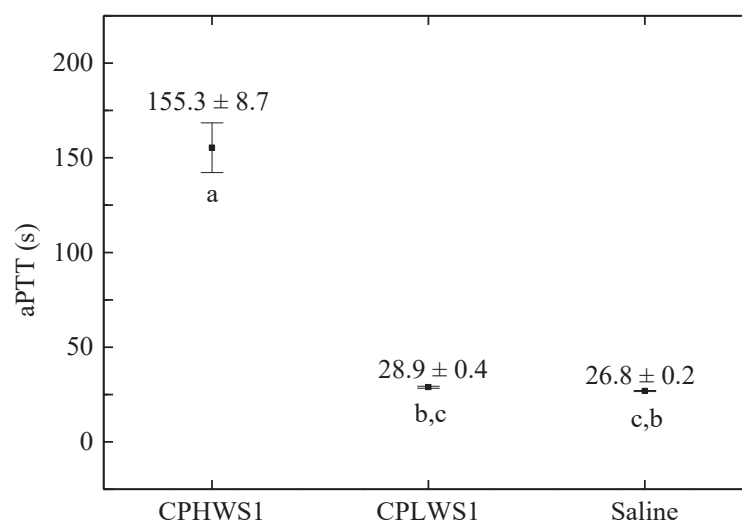


Figure 6. Effect of CPHWS1 and CPLWS1, after 6 months stocked, on aPTT of citrated human plasma. Samples were tested at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (final concentration, considering the volumes of plasma + sample). Results are expressed as mean \pm SD ($n = 4$).

CPHWS1 considerably lost its anticoagulant activity after storage. At 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the aPTT was above 300 s before storage. And, CPLWS1 did not even present anticoagulant activity at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Although sulfated derivatives from citrus pectin have good anticoagulant activity as soon as they are synthesized, the results indicate that they do not have stability over time, at least under the conditions in which they were stored.

It is very important to evaluate the stability of these molecules, especially if considered a future possibility of industrial production and commercialization. There are no other studies in the literature evaluating the stability of chemically sulfated citrus pectin and, as shown here, this needs to be considered and also evaluated under new storage conditions, such as low temperatures.

3.3 Carboxyl-reduction

CP is predominantly a homogalacturonan, formed mainly by $\rightarrow 4$)- α -D-GalAp-(1 \rightarrow units, so its chemical sulfation can lead to 2-*O*- and 3-*O*-sulfated structures. The process of carboxyl-reduction on CPHWS1 and CPLWS1 leads to the conversion of galacturonic acid to galactose. Under this new condition, the influence of the hydroxyl groups at C6 on

anticoagulant activity can be evaluated. Moreover, the molecules can be resulfated in order to evaluate the effect of 6-*O*-sulfate on anticoagulant activity.

CPHWS1 and CPLWS1 were subjected to 1 and 4 cycles of carboxyl-reduction, generating derivatives with different ratios of GalAp to Galp, and their anticoagulant activities were analyzed.

3.3.1 Carboxyl-reduction of CPHWS1

CPHWS1 was subjected to 1 and 4 cycles of carboxyl-reduction, obtaining CPHWS1CR1 and CPHWS1CR4. ^1H - ^{13}C -HSQC-edited analysis shows that the carboxyl-reduction was effective, due to the appearance of inverted $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ correlations in the region of δ 60.1/4.04/3.65 ppm, corresponding to C6/H6 of $\rightarrow 4$ - α -D-Galp-(1 \rightarrow) (Figure 7).

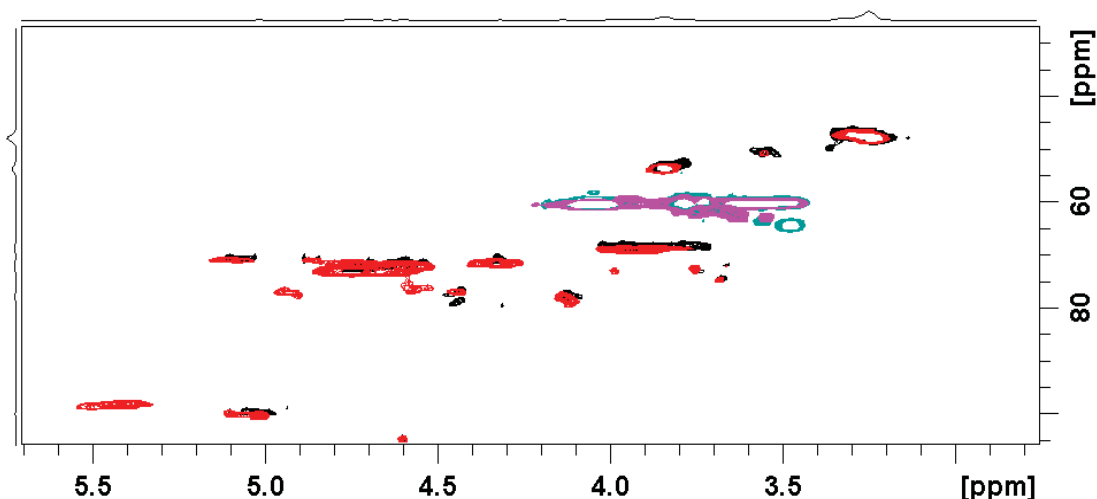


Figure 7. ^1H - ^{13}C -HSQC-edited analysis of CPHWS1CR1 (black and green) and CPHWS1CR4 (red and pink).

The measurement of uronic acids corroborated the ^1H - ^{13}C -HSQC-edited analysis, with CPHWS1CR1 and CPHWS1CR4 showing 50.9% and 11.2% of uronic acids, respectively. HPSEC analyzes from CPHWS1CR1 and CPLWS1CR4 (Figure 1a) showed that they have homogeneous elution profiles, with the presence of only one peak, corresponding to 154.82×10^3 g/mol and 90.13×10^3 g/mol, respectively. The Mw of CPHWS1CR1 and CPHWS1CR4 decreased in comparison with CPHWS1 (206.41×10^3 g/mol), this may be related to the conditions of the carboxyl-reduction reaction that make the polysaccharide more susceptible to cleavage, as this phenomenon has been reported in the literature for CP in the study of MAAS *et al.* (2012).

The anticoagulant activities of CPHWS1CR1 and CPHWS1CR4 were evaluated (Figure 4a). According to the slopes of the linear equations, CPHWS1CR1 and CPHWS1CR4

were 2.3 and 1.6 times less potent than CPHWS1. This is corroborated by the analysis of the DS, which showed a decrease to 0.64 for both CPHWS1CR1 and CPHWS1CR4, in comparison with the DS of 1.41 of CPHWS1, this seems to indicate that the conditions of carboxyl-reduction reaction can lead to the removal of sulfate groups from the structure. Therefore, the removal of carboxyl groups, associated with removal of sulfate groups, after the carboxyl-reduction process, decreased the anticoagulant activity. SANTOS-FIDENCIO *et al.*, (2019) that studied the effect of carboxyl group on the anticoagulant activity of oxidized carrageenans and YANG *et al.*, (2005) that studied the structure–anticoagulant activity relationships of sulfated lacquer polysaccharide, verified there is a synergic effect of carboxyl and sulfate groups, which is important for the anticoagulant activity of some polysaccharides. Sulfated derivatives from CP possibly interact with coagulation factors mainly through ionic bonds involving their sulfate and carboxyl groups, as occurs with heparin (OLSON *et al.*, 2010), therefore, these groups are important for their bioactivity.

3.3.2 Carboxyl-reduction of CPLWS1

CPLWS1 was also subjected to 1 and 4 cycles of carboxyl-reduction, obtaining CPLWS1CR1 and CPLWS1CR4. ^1H - ^{13}C -HSQC-edited analysis shows that the carboxyl-reduction was effective, due to the appearance of inverted $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ correlations in the region of δ 60.4/4.05/3.67 ppm, corresponding to C6/H6 of $\rightarrow 4$ - α -D-Galp-(1 \rightarrow as (Figure 8).

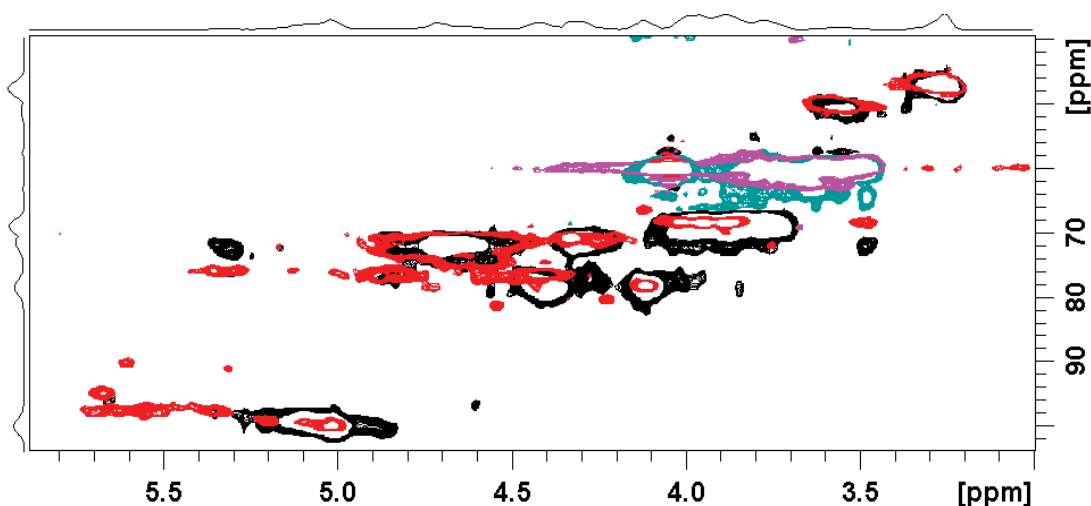


Figure 8. ^1H - ^{13}C -HSQC-edited analysis of CPLWS1CR1 (black and green) and CPLWS1CR4 (red and pink).

The measurement of uronic acids corroborated the ^1H - ^{13}C -HSQC-edited analysis, with CPLWS1CR1 and CPLWS1CR4 showing 36.5% and 5.0% of uronic acids, respectively. HPSEC analyses from CPLWS1CR1 and CPLWS1CR4 (Figure 1b) showed that they have

homogeneous elution profiles, with the presence of only one peak, corresponding to 7.74×10^3 g/mol and 7.98×10^3 g/mol, respectively. The Mw of CPLWS1CR1 and CPLWS1CR4 decreased in comparison with CPLWS1 (10.32×10^3 g/mol), probably due to the conditions of the carboxyl-reduction reaction (MAAS *et al.* (2012)).

The anticoagulant activities of CPLWS1CR1 and CPLWS1CR4 were evaluated (Figure 4b). According to the slopes of the linear equations, CPLWS1CR1 and CPLWS1CR4 were 2.5 and 2.0 times less potent than CPLWS1. The DS analysis was 0.43 for CPLWS1CR1 and 0.51 for CPLWS1CR4. In the case of low molecular weight derivatives, the carboxy-reduction process had little effect on DS, since that for CPLWS1 was 0.52. Although the sulfate content practically did not change after the carboxyl-reduction process, the removal of carboxyl groups decreased the anticoagulant activity, reinforcing the possible synergic effect of carboxyl and sulfate groups for anticoagulant activity, as described by SANTOS-FIDENCIO *et al.*, (2019) and YANG *et al.*, (2005).

3.4 Sulfation after carboxyl-reduction

3.4.1 Sulfation of CPHWS1CR1 and CPHWS1CR4

Both carboxyl-reduced samples obtained from CPHWS1 were subjected to a second cycle of chemical sulfation using the optimized conditions described in section 3.2.1. After the sulfation, CPHWS1CR1 and CPHWS1CR4 were named CPHWS2CR1 and CPHWS2CR4. They showed homogenous elution profiles on HPSEC analysis, with Mw of 130.45×10^3 g/mol and 75.95×10^3 g/mol, respectively (Figure 1a), which are lower in comparison with the previous fractions, reinforcing that chemical sulfation can lead to hydrolytic degradation of polysaccharides.

The anticoagulant activities of CPHWS2CR1 and CPHWS2CR4 were evaluated (Figure 4a). According to the slopes of the linear equations, the anticoagulant activities of CPHWS2CR1 and CPHWS2CR4 were the highest observed in this study. The first one was 1.4 times more potent than CPHWS1, whereas the last one was 2.6 times more potent than CPHWS1 and only 4.0 times less potent than heparin. CPHWS2CR1 and CPHWS2CR4 had DS values of 1.09 and 1.27, lower than that of CPHWS1 (DS = 1.41), reinforcing that the position where the sulfate group is attached on the structure is more important than its amount (SANTOS-FIDENCIO *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2005; MESTECKINA; SHCHERBUKHIN, 2010; MELO *et al.*, 2004; POMIN, 2009). In the case of CP, substitution of carboxyl by sulfate groups at C6, increases the anticoagulant activity, confirming what was observed by MAAS *et al.* (2012). Although carboxyl groups increase the charge density in the

polysaccharide structures, and cooperatively with sulfate groups assist the interaction of polysaccharides with proteins of the coagulation cascade, the sulfate-protein interaction is greater than carboxyl-protein (YANG *et al.*, 2005). If CPHWS2CR1 and CPHWS2CR4 were compared, the last one was 1.8 times more potent, corroborating the preference of sulfate instead carboxyl group for anticoagulant activity.

^1H - ^{13}C -HSQC-edited analysis of CPHWS2CR4 (Figure 9) showed an intense signal around δ 72.5/4.69 ppm, indicating the presence of sulfate groups at O-2 and/or O-3 positions but, contrary to what was expected, it was not possible to see displacement in the C6/H6 correlation, suggestive of sulfation at O-6. Probably, the presence of sulfate groups in O-2 and O-3 of CPHWS1CR4 sterically prevented the entry of new sulfate groups in the structure, contributing to non-insertion of sulfate groups in O-6.

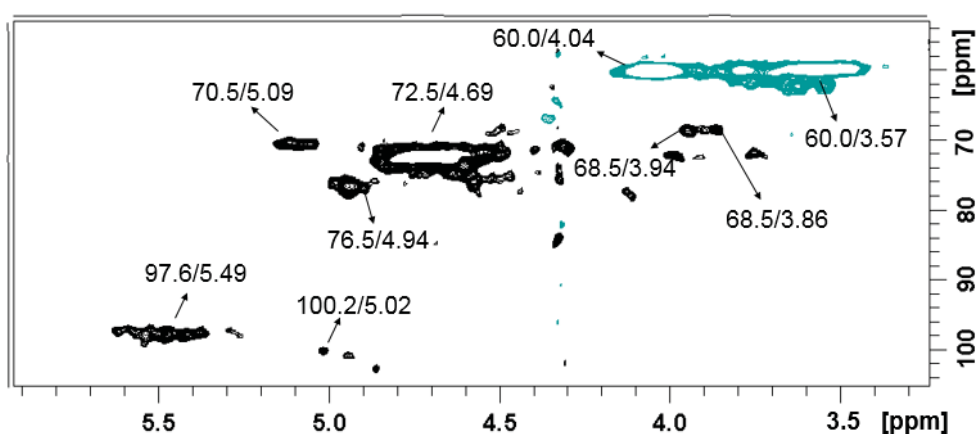


Figure 9. ^1H - ^{13}C -HSQC-edited analysis of CPHWS2CR4.

3.4.2 Sulfation of CPLWS1CR1 and CPLWS1CR4

Both carboxyl-reduced samples obtained from CPLWS1 were subjected to a second cycle of chemical sulfation cycle using the optimized conditions described in section 3.2.2. After the sulfation, CPLWS1CR1 and CPLWS1CR4 were named CPLWS2CR1 and CPLWS2CR4. They showed homogeneous elution profiles on HPSEC analysis, with Mw of 13.33×10^3 g/mol and 7.98×10^3 g/mol (Figure 1b). In this case, it is possible to see an increase or at least a maintenance of the Mw before chemical sulfation, in comparison with the previous fractions, which had already been verified during the sulfation of CPLW (7.5×10^3 g/mol), giving CPLWS1 (10.32×10^3 g/mol). This seems to be a characteristic of low molecular weight citrus pectins, as already discussed in section 3.2.3.

The anticoagulant activities of CPLWS2CR1 and CPLWS2CR4 were evaluated (Figure 4b). According to the slopes of the linear equations, the anticoagulant activities of

CPLWS2CR1 and CPLWS2CR4 were the highest among the low molecular weight derivatives. The first one was 7.5 times more potent than CPLWS1, whereas the last one was 2.5 times more potent than CPLWS1. Moreover, CPLWS2CR1 was and only 1.6 times less potent than enoxaparin. CPLWS2CR1 and CPLWS2CR4 had DS values of 1.30 and 0.64, higher than that of CPLWS1 (DS = 0.52). Again, substitution of carboxyl by sulfate groups at C6, increases the anticoagulant activity of CP derivatives. However, what draws attention is that CPLWS2CR1 presented better results than CPLWS2CR4. Contrary to what was expected, the first one had higher DS and higher anticoagulant activity, although the last one had more points for sulfation, since it has more C6 points available for this.

^1H - ^{13}C -HSQC-edited analysis of CPLWS2CR1 (Figure 10) showed an intense signal around δ 72.6/4.69 ppm, indicating sulfation at O-2 and/or O-3 positions, and an inverted signal at δ 65.3/4.37 ppm corresponding to C6/H6 of 6-*O*-sulfated Galp units. Unlike CPHW derivatives, CPLW derivatives showed lower DS values when optimizing chemical sulfation was performed. Therefore, when the carboxyl-reduction process and the second sulfation cycle were carried out, there were probably fewer sulfate groups in this structure, which contributed to the CPLW derivatives having higher DS values after the second sulfation cycle. The smaller amount of sulfate group contributed to the second cycle of chemical sulfation, with greater insertion of these groups, with no repulsion between them, and also facilitating the entry of these groups in the O-6 position.

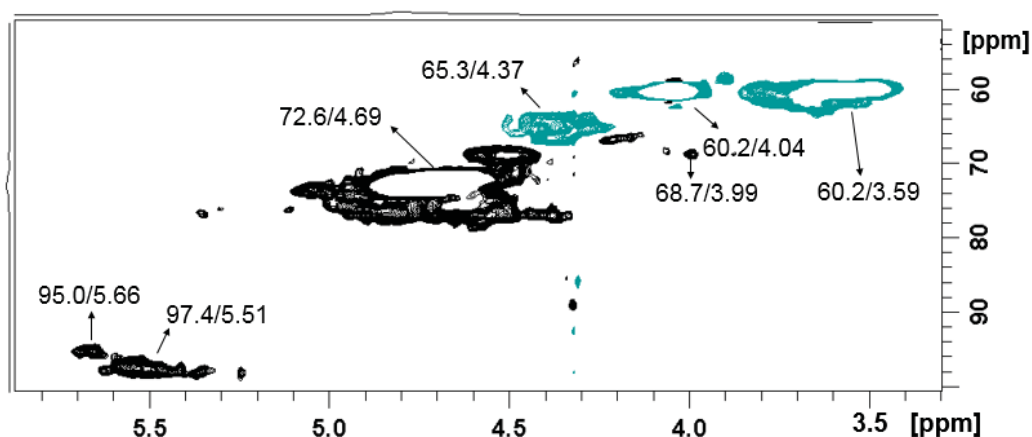


Figure 10. ^1H - ^{13}C -HSQC-edited analysis of CPLWS2CR1.

3.5 Effect of CPHWS2CR4 and CPLWS2CR1 on α -thrombin and factor Xa activities

After optimization of chemical sulfation, carboxyl-reduction and the second cycle of sulfation, sequentially carried out on CPHW and CPLW, the derivatives that had the best anticoagulant activities were CPHWS2CR4 and CPLWS2CR1.

Heparin acts as anticoagulant by a serpin-dependent mechanism, binding to AT and enhancing its inhibitory effect on FIIa and FXa (JIN; GOPINATH, 2016). HCII also has its inhibitory effect increased in the presence of heparin, however HCII inhibits only FIIa, and has no action on other coagulation proteases (RAU *et al.*, 2007). The study of the anticoagulant mechanism of CPHWS2CR4 and CPLWS2CR1 (Figures 11 and 12), was then carried out to evaluate the effect of both on FIIa and FXa activities in the presence or absence of serpins.

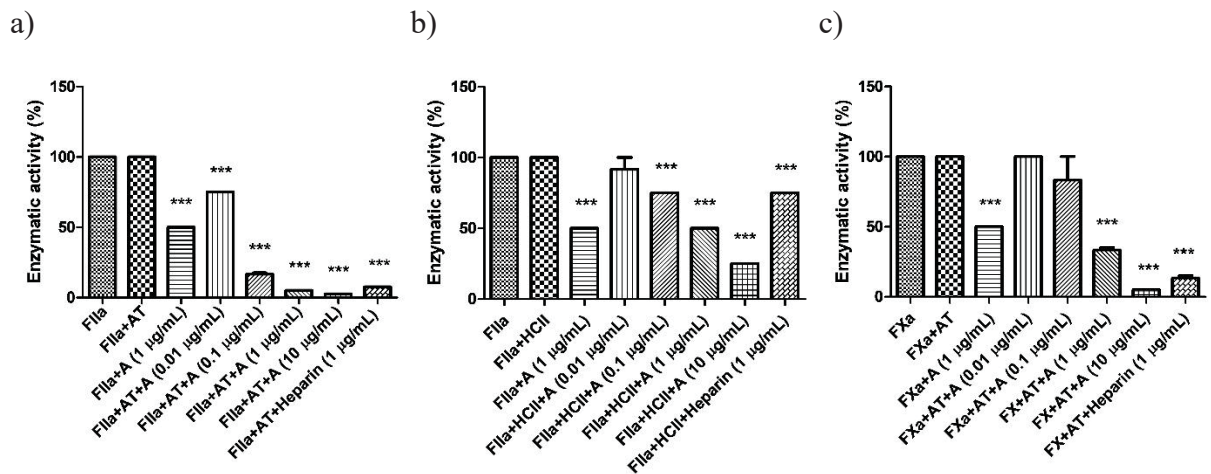


Figure 11. Effect of CPHWS2CR4 on FIIa+AT (a), FIIa+HCII (b) and FXa+AT (c) activities. CPHWS2CR4 is named by A; FIIa (α -thrombin); FXa (Factor Xa); AT (antithrombin); HCII (heparin cofactor II). Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$, with 100% of activity considered to be that occurring without addition of polysaccharide and serpin. $p < 0.05^*$, 0.01^{**} and 0.001^{***} , when compared with the reaction without polysaccharide and serpin.

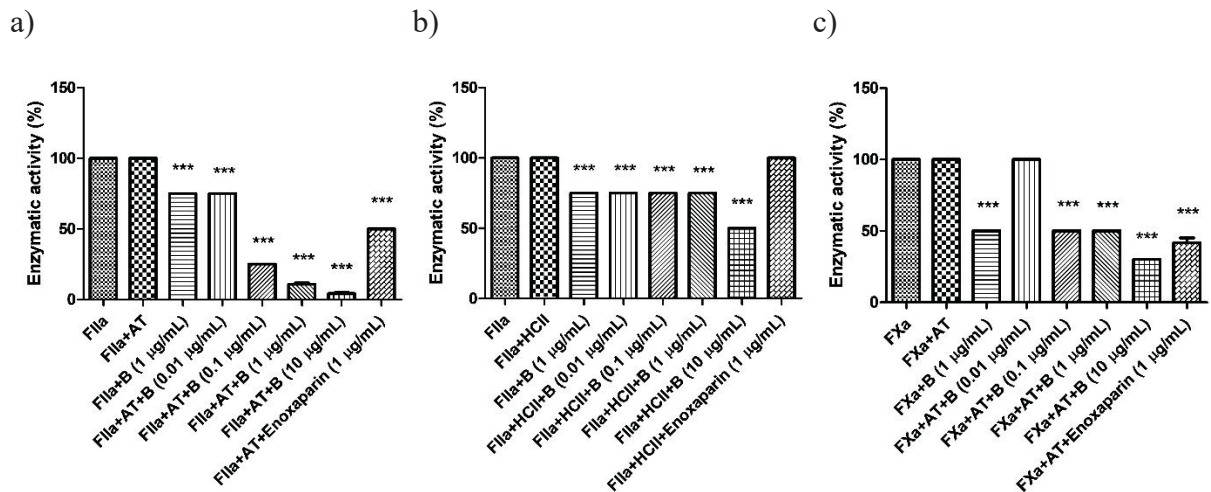


Figure 12. Effect of CPLWS2CR1 on FIIa+AT (a), FIIa+HCII (b) and FXa+AT (c) activities. CPLWS2CR1 is named by B; FIIa (α -thrombin); FXa (Factor Xa); AT (antithrombin); HCII (heparin cofactor II). Results are expressed as mean \pm SD, $n = 3$, with 100% of activity considered to be that occurring without addition of polysaccharide and serpin. $p < 0.05^*$, 0.01^{**} and 0.001^{***} , when compared with the reaction without the polysaccharide and serpin.

AT and HCII did not directly inhibit FIIa and FXa at the concentrations tested (Figures 11 and 12; FIIa+AT, FIIa+HCII, FXa+AT). This was already reported by Melo *et al.* (2004). FIIa activity decreased to 50% and 75% only with the presence of CPHWS2CR4 and CPLWS2CR1 at 1 $\mu\text{g/mL}$, without serpins, respectively. When CPHWS2CR4 and CPLWS2CR1 at 1 $\mu\text{g/mL}$ were incubated in the presence of AT, FIIa activity decreased to 5% and 10.8%, respectively (Figures 11a and 12a). These effects were higher than those of heparin and enoxaparin, which reduced FIIa activity to 7.5% and 50%, in the presence of AT. These results suggest that both CPHWS2CR4 and CPLWS2CR1 have a direct inhibitory action on FIIa, which is potentiated in the presence of AT.

On the other hand, CPHWS2CR4 and CPLWS2CR1 at 1 $\mu\text{g/mL}$ did not have their inhibitory effects on FIIa potentiated in the presence of HCII (Figures 11b and 12b). The higher inhibitory effects on FIIa at 10 $\mu\text{g/mL}$ are probably due to the increased concentration of CPHWS2CR4 and CPLWS2CR1 rather than the presence of HCII.

CPHWS2CR4 and CPLWS2CR1 at 1 $\mu\text{g/mL}$ were also able to inhibit FXa without AT, both decreasing FXa activity to 50%. When CPHWS2CR4 at 1 $\mu\text{g/mL}$ was incubated in the presence of AT, FXa activity decreased to 33.3%. However, CPLWS2CR1 at 1 $\mu\text{g/mL}$ did not have its inhibitory effect on FXa potentiated in the presence of AT. These results suggest that both CPHWS2CR4 and CPLWS2CR1 have a direct inhibitory action on FXa, and that of CPHWS2CR4 is potentiated in the presence of AT.

In general, higher inhibitory effects on FIIa and FXa were observed for the high molecular weight derivative CPHWS2CR4. Similarly, when heparin and enoxaparin are compared to each other, the first one has a higher inhibitory effect on FIIa and FXa. Thus, the anticoagulant activity depends on the molecular weight of the polysaccharide, which affects its interaction with coagulation proteases and serpins (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010). Moreover, CPHWS2CR4 and CPLWS2CR1 were able to inhibit FIIa and FXa by a serpin-independent mechanism, which is different from heparin. The inhibitory effects were higher on FIIa, and especially in this case they were potentiated by AT.

Cipriani *et al.* (2009), studying chemically sulfated citrus pectin derivatives, also observed inhibitory effects on FIIa and FXa by a mechanism serpin-independent. Therefore, this is probably a characteristic of this type of molecule. This mechanism is different from that of heparin, which depends on AT or HCII to perform its action (ONISH *et al.*, 2016). In this way, sulfated derivatives from citrus pectin, such as CPHWS2CR4 and CPLWS2CR1, may perhaps be an alternative for serpin-deficient patients.

4. Conclusion

The optimization of chemical sulfation of CPHW and CPLW lead to the parameters where was possible to achieve better anticoagulant activities. For CPHWS1 the best parameters were ηSO_3 -pyridine/OH of 9 Vt/w of 100 mL/g and 8 h of reaction, and for CPLWS1 the parameters were ηSO_3 -pyridine/OH of 9, Vt/m of 100 mL/g and 4 h of reaction. CPHW had higher DS values than CPLW, this may be associated with the fact that CPHW is partially methylesterified, which neutralize the charge of the carboxyl group present in the CP structure, helping in the solubility during the reaction, providing better conditions for the insertion of the sulfate group.

Subsequently, the sulfated derivatives were carboxyl-reduced, decreasing the anticoagulant activity, reinforcing the role of the carboxyl groups in anticoagulant activity. Finally, the carboxyl-reduced samples were submitted to a second sulfation reaction, using the optimized parameters, resulting in the derivatives with the best anticoagulant activities (CPHWS2CR4 and CPLWS2CR1). The CPLW derivatives (S1) presented lower DS values in the first sulfation cycle, and therefore, in the second sulfation cycle (S2) this was a favorable factor, as it allowed the entry of new sulfate groups, without steric repulsion with the previously inserted sulfate groups, presenting thus, in the second sulfation cycle (S2), higher values of DS, as well as the insertion of the sulfate group in O-6 was observed. Instead, the derivatives of CPHW already had high DS values in the first sulfation cycle (S1), thus, these groups possibly prevented the entry of new sulfate groups by charge repulsion, which led to lower DS values, and consequently also prevented the insertion of these in position O-6, in the second sulfation cycle (S2). The sulfated derivatives from citrus pectin (CPHWS2CR4 and CPLWS2CR1) were able to inhibit FIIa and FXa by a serpin-independent mechanism, which is different from heparin. This study made it possible to better understand the correlation between the structure-activity of CP, enabling the obtainment of molecules with better anticoagulant activities.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Brazilian agencies *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq grant numbers 134080/2019-0, 420986/2018-9 and 306538/2018-0) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), and the UFPR-RMN Center.

References

- ADAMS, G.A., Complete acid hydrolysis, in: R.L. Whistler (Ed.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press Inc., New York/London, 1965a, p. 269–276.
- ADAMS, G.A., Acid hydrolysis of weak linkages, in: R.L. Whistler (Ed.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press Inc., New York/London, 1965b, p. 285–287.
- BAE, I. Y.; *et al.* Effect of sulfation on the physicochemical and biological properties of citrus pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1980 – 1983, 2009.
- BEDINI, E.; *et al.* A review of chemical methods for the selective sulfation and desulfation of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 1224 – 1239, 2017.
- CAFFALL, K. H.; MOHNEN D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1879 – 1900, 2009.
- CIPRIANI, T. R.; *et al.* Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. **Blood Coagulation, Fibrinolysis and Cellular Haemostasis**, p. 860 – 866, 2009.
- CIUCANI, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209 – 217, 1984.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, p. 106 – 110, 1962.
- FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157 – 162, 1991.
- GONÇALVES, A. G.; *et al.* Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: preparation and capillary electrophoresis separation. **Carbohydrate Research**, v. 340, 2123 – 2134, 2005.
- HU, Y.; *et al.* Sulfation of citrus pectin by pyridine-sulfur trioxide complex and its anticoagulant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 1162 – 1167, 2015.
- JIN, N. Z.; GOPINATH, S. C. B. Potential blood clotting factors and anticoagulants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 356 - 365, 2016.

LARM, O.; *et al.* The preparation of a heparin analogue from alginic acid. **Carbohydrate Research**, v. 73, p. 332 – 336, 1979.

LEVI, M.; SIVAPALARATNAM, S. Coagulation and anticoagulation in the intraoperative setting. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 58, p. 386 – 391, 2019.

LIANG, L.; *et al.* Sulfated modification and anticoagulant activity of pumpkin (*Cucurbita pepo*, Lady Godiva) polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1 – 9, 2017.

LIU, D.; *et al.* Monosaccharide composition analysis of polysaccharides from natural sources: Hydrolysis condition and detection method development. **Food Hydrocolloids**, v. 116, p. 106641, 2021.

LU, X.; *et al.* Sulfation modification and anticoagulant activity of the polysaccharides obtained from persimmon (*Diospyros kaki L.*) fruits. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1189 – 1195, 2012.

MAAS, N. C.; *et al.* Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: influence on anticoagulant and antithrombotic effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1081 – 1087, 2012.

MARTINICHEN-HERRERO, J. C.; *et al.* Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, p. 97 – 102, 2005.

MELO, F. R.; *et al.* Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides: different mechanisms for heparina and sulfated galactans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 20824 – 20835, 2004.

MESTECHKINA, N. M.; SHCHERBUKHIN, V. D. Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, p. 267 – 273, 2010.

NAGPAL, M., *et al.* Optimization of sulfation of okra fruit gum for improved rheological and pharmacological properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1 – 9, 2019.

OCHOA, Y. R.; *et al.* Sulfation of fucogalactan from *Agaricus bisporus*: different patterns in the chemical structure and their effects on anticoagulant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 357 – 364, 2017.

OCHOA-VILLARREAL, M.; *et al.* Plant cell wall polymers: function, structure and biological activity of their derivatives. **Polymerization**, GOMES, A. S. IntechOpen, 2012.

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

OLSON, S. T., *et al.* Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. **Biochimie**, v. 92, p. 1587 – 1596, 2010.

OLSON, J. D. D-dimer: An Overview of Hemostasis and Fibrinolysis, Assays, and Clinical Applications. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 69, p. 1 - 46, 2015.

ONISH, A.; *et al.* Heparin and anticoagulation. **Frontiers in Bioscience**, v. 21, p. 1372 – 1392, 2016.

POMIN, V. H. Review An Overview About the Structure–Function Relationship of Marine Sulfated Homopolysaccharides with Regular Chemical Structures. **Biopolymers**, v. 91, p. 601 – 609, 2009.

RABER MN. Coagulation Tests. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. **Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations**. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990.

RAU, J. C.; *et al.* Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, p. 102–115, 2007.

ROMÁN Y.; *et al.* Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated fucogalactan and citrus pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 731 – 739, 2017.

ROMÁN, Y.; *et al.* Optimization of chemical sulfation, structural characterization and anticoagulant activity of *Agaricus bisporus* fucogalactan. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 345 – 352, 2016.

SANTANA, A. G.; *et al.* Identification of potential targets for an anticoagulant pectin. **Journal of Proteomics**, p. 1 – 8, 2016.

SANTOS-FIDENCIO, G. C.; *et al.* Effects of carboxyl group on the anticoagulant activity of oxidized carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 214, p. 286 – 293, 2019.

SINGH, A. K.; *et al.* 2- Bioactive and drug-delivery potentials of polysaccharides and their derivatives. **Polysaccharide Carriers for Drug Delivery**, p. 19 – 48, 2019.

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

WANG, Z.; *et al.* Sulfated modification of polysaccharides: synthesis, characterization and bioactivities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 74, p. 147 – 157, 2018.

XU, Y.; *et al.* Chemically modified polysaccharides: synthesis, characterization, structure activity relationships of action. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 970 – 977, 2019.

YANG, J.; *et al.* The structure–anticoagulant activity relationships of sulfated lacquer polysaccharide: Effect of carboxyl group and position of sulfation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 9 – 15, 2005.

ZHANG, J.; *et al.* The optimization of sulfation modification conditions for ophiopogonpolysaccharide based on antiviral activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 657 – 662, 2012.

ZHOU, C. L.; *et al.* Isolation, characterisation and sulphation of soluble polysaccharides isolated from *Cucurbita máxima*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 508 – 514, 2014.

5 CONCLUSÃO

A otimização da sulfatação química da PC de alta e baixa massa molecular conduziu a parâmetros em que foi possível alcançar melhores atividades anticoagulantes. Para a PC de alta e baixa massa molecular os melhores parâmetros foram: η SO₃-piridina/OH de 9, Vt/m de 100 mL/g e 8 h e 4 h de reação, respectivamente. Posteriormente, os derivados sulfatados foram carboxirreduzidos, o que levou a menores atividades anticoagulantes, possivelmente associado às condições da reação de carboxirredução, e reforçando o papel do grupo carboxila na ação anticoagulante. Por fim, as amostras carboxirreduzidas foram resulfatadas utilizando os parâmetros otimizados, resultando nos derivados com as melhores atividades anticoagulantes (CPHWS2CR4 e CPLWS2CR1), o que sugere que a interação entre grupamento sulfato-proteína é maior que a interação dos grupamentos carboxílicos-proteína na cascata de coagulação. Estes derivados, foram capazes de inibir FIIa e FXa por um mecanismo independente da serpina, diferentemente da heparina, o que é interessante para a utilização em pacientes que tenham deficiência nestas serpinas.

A otimização da sulfatação química e outras alterações realizadas na estrutura da PC de alta e baixa massa molecular, mostraram exercer grande influência em suas atividades anticoagulantes, permitindo otimizar sua bioatividade. Este estudo permite um melhor entendimento do comportamento dos derivados sulfatados da PC, contribuindo para futuras pesquisas e aplicações dos mesmos. Além disso, apresenta uma abordagem para a síntese de macromoléculas funcionalizadas, com melhores atividades anticoagulante.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Além dos estudos realizados, é interessante fazer um estudo *in vivo* com PCAMS2CR4 e PCBMS2CR1, para avaliação da possível atividade antitrombótica, avaliação do efeito hemorrágico e alergênico, contribuindo ainda mais para o entendimento de seu desempenho.

Além disso, para a PCBMS2CR1 seria interessante um ensaio de aPTT *ex vivo*, avaliando a sua absorção quando administrada por via subcutânea, via pela qual são administradas as heparinas de baixa massa molecular.

REFERÊNCIAS

ALBAN, S.; FRANZ, G. Anticoagulant activities of β -1,3-glucansulfates in dependence on their molecular weight. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 2403 – 2406, 1994.

ALQUWAIZANI, M.; et al. Anticoagulants: A Review of the Pharmacology, Dosing, and Complications. **Current Emergency and Hospital Medicine**, v. 1, p. 83 – 97, 2013.

BAE, I. Y.; *et al.* Effect of sulfation on the physicochemical and biological properties of citrus pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1980 – 1983, 2009.

BABER, U.; MASTORIS, I.; MEHRAN, R. Balancing ischaemia and bleeding risks with novel oral anticoagulants. **Nature Reviews Cardiology**, v. 11, p. 693 – 703, 2014.

BARDDAL, H. P. O.; *et al.* Anticoagulant activity of native and partially degraded glycolglucuronomannan after chemical sulfation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 328 – 333, 2015.

BASHAW, M.; TRIPLETT, S. Coagulopathy In and Outside the Intensive Care Unit. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 29, p. 353 - 362, 2017.

BEDINI, E.; *et al.* A review of chemical methods for the selective sulfation and desulfation of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 1224 – 1239, 2017.

BERNA-ERRO, A.; *et al.* Molecular Interplay between Platelets and the Vascular Wall in Thrombosis and Hemostasis. **Current Vascular Pharmacology**, v. 11, p. 409 - 430, 2013.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1879 – 1900, 2009.

CAO, S.; *et al.* Anticoagulant and antithrombotic properties *in vitro* and *in vivo* of a novel sulfated polysaccharide from marine green alga *Monostroma nitidum*. **Marine Drugs**, p. 1 – 21, 2019.

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.

CARRION, C. C.; *et al.* Lignin, lipid, protein, hyaluronic acid, starch, cellulose, gum, pectin, alginate and chitosan-based nanomaterials for cancer nanotherapy: Challenges and opportunities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 178, p. 193 – 228, 2021.

CASU, B.; NAGGI, A.; TORRI, G. Re-visiting the structure of heparin. **Carbohydrate Research**, v. 403, p. 60-68, 2015.

CIPRIANI, T. R.; *et al.* Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. **Blood Coagulation, Fibrinolysis and Cellular Haemostasis**, p. 860 – 866, 2009.

CUNHA, P. L. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeo da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, p. 649 – 660, 2009.

DE ARAÚJO, C. A.; *et al.* Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 483 – 491, 2013.

DE ARAUJO, D. F.; *et al.* Structural characterization of anticoagulant and antithrombotic polysaccharides isolated from *Caesalpinia ferrea* stem barks. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 175, p. 147 – 155, 2021.

DEVLIN, T. M. Manual de Bioquímica com correlações clínicas. Edgard Blücher. 5ª edição, 2002.

DEWALD, T. A.; WASHAM, J. B. Anticoagulants Pharmacokinetics, Mechanisms of Action, and Indications. **Neurosurgery Clinics of North America**, v.29, p. 503 – 515, 2018.

FAN, L.; *et al.* Synthesis and anticoagulant activity of pectin sulfates. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, p. 2171 – 2178, 2011.

FAVALORO; E. J.; LIPPI, G.; KOUTTS, J. Laboratory testing of anticoagulants: the present and the future. **Pathology**, v. 43, p. 682 – 692, 2011.

FRANCHINI, M. Hemostasis and aging. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 60, p. 144 - 151, 2006.

GALE, A. J. Current Understanding of Hemostasis. **Toxicologic Pathology**, v. 39, p. 273 - 280, 2011.

GAO, N.; *et al.* Purification, structural characterization and anticoagulant activities of four sulfated polysaccharides from sea cucumber *Holothuria fuscopunctata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3421 – 3428, 2020.

GRACHER, A. H. P.; *et al.* Antithrombin and heparin cofactor II-mediated inactivation of α - thrombin by a synthetic, sulfated mannogalactan. **Thrombosis Research**, v. 126, p. 180 – 187, 2010.

HAN, H.; *et al.* Evaluation and Management of Coagulopathies and Thrombophilias in Pediatric Patients. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 41, p. 83 – 100, 2021.

HE, L.; *et al.* Heparin cofactor II inhibits arterial thrombosis after endothelial injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 213 – 219, 2002.

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

HU, Y.; *et al.* Sulfation of citrus pectin by pyridine-sulfur trioxide complex and its anticoagulant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 1162 – 1167, 2015.

JAI, R. M.; LUI, P. How anticoagulants work. **Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management**, v. 10, p. 30 - 39, 2006.

JIN, N. Z.; GOPINATH, S. C. B. Potential blood clotting factors and anticoagulants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 356 - 365, 2016.

LARM, O.; *et al.* The preparation of a heparin analogue from alginic acid. **Carbohydrate Research**, v. 73, p. 332 – 336, 1979.

LEVI, M.; SIVAPALARATNAM, S. Coagulation and anticoagulation in the intraoperative setting. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 58, p. 386 – 391, 2019.

LI, X.; *et al.* A regular fucan sulfate from *Stichopus herrmanni* and its peroxide depolymerization: Structure and anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 256, p. 117513, 2021.

LIANG, L.; *et al.* Sulfated modification and anticoagulant activity of pumpkin (*Cucurbita pepo*, Lady Godiva) polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1 – 9, 2017.

LU, X.; *et al.* Sulfation modification and anticoagulant activity of the polysaccharides obtained from persimmon (*Diospyros kaki L.*) fruits. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1189 – 1195, 2012.

MAAS, N. C.; *et al.* Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: influence on anticoagulant and antithrombotic effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1081 – 1087, 2012.

MAKARYUS, J. N.; HALPERIN, J. L.; LAU, J. F. Oral anticoagulants in the management of venous thromboembolism. **Nature Reviews Cardiology**, v.10, p. 397 – 409, 2013.

MARCUM, J. A. The development of heparin in Toronto. **Journal of the History of Medicine**, v. 52, p. 310 – 337, 1997.

MARTINICHEN-HERRERO, J. C.; *et al.* Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, p. 97 – 102, 2005.

MCCARTHY, C. P.; *et al.* Running thin: implications of a heparin shortage. **The Lancet**, v. 395, p. 534 – 36, 2020.

MESTECKINA, N. M.; SHCHERBUKHIN, V. D. Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, p. 267 – 273, 2010.

MJOVSKI, M. B. Advances in monitoring anticoagulant therapy. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 90, p. 197 – 213, 2019.

MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin sulfated fucans from marine invertebrates. **TCM**, v. 9, p. 225 – 232, 1999.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWEL, V. W. Hemostasia e Trombose. Harper Bioquímica Ilustrada. São Paulo: McGraw-Hill, 27 ed, 2007.

NAGPAL, M., *et al.* Optimization of sulfation of okra fruit gum for improved rheological and pharmacological properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1 – 9, 2019.

OCHOA, Y. R.; *et al.* Sulfation of fucogalactan from *Agaricus bisporus*: different patterns in the chemical structure and their effects on anticoagulant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 357 – 364, 2017.

OCHOA-VILLARREAL, M.; *et al.* Plant cell wall polymers: function, structure and biological activity of their derivatives. **Polymerization**, GOMES, A. S. IntechOpen, 2012.

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

O'KEEFFE, D.; *et al.* The Heparin Binding Properties of Heparin Cofactor II Suggest an Antithrombin-like Activation Mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 50267 – 50273, 2004.

OLSON, S. T., *et al.* Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. **Biochimie**, v. 92, p. 1587 – 1596, 2010.

OLSON, J. D. D-dimer: An Overview of Hemostasis and Fibrinolysis, Assays, and Clinical Applications. **Advances in Clinical Chemistry**, p. 1 - 46, 2015.

O'NEILL, A. Sulphated derivatives of laminarin. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 33, 1097 – 1101, 1955.

ONISH, A.; *et al.* Heparin and anticoagulation. **Frontiers in Bioscience**, v. 21, p. 1372 – 1392, 2016.

PANNUCCI, C. J.; *et al.* Utility of anti-factor Xa monitoring in surgical patients receiving prophylactic doses of enoxaparin for venous thromboembolism prophylaxis. **The American Journal of Surgery**, v. 213, p. 1143 – 1152, 2017.

RABER MN. Coagulation Tests. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. **Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations**. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990.

RAU, J. C.; *et al.* Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, p. 102–115, 2007.

ROMÁN Y.; *et al.* Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated fucogalactan and citrus pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 731 – 739, 2017.

ROMÁN, Y.; *et al.* Optimization of chemical sulfation, structural characterization and anticoagulant activity of *Agaricus bisporus* fucogalactan. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 345 – 352, 2016.

SALABEL, J. K. COVID-19 Coagulopathy: Current knowledge and guidelines on anticoagulation. **Heart & Lung**, v. 50, p. 357 – 360, 2021.

SANTANA, A. G.; *et al.* Identification of potential targets for an anticoagulant pectin. **Journal of Proteomics**, p. 1 – 8, 2016.

SANTOS-FIDENCIO, G. C.; *et al.* Effects of carboxyl group on the anticoagulant activity of oxidized carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 214, p. 286 – 293, 2019.

SINGH, A. K.; *et al.* 2- Bioactive and drug-delivery potentials of polysaccharides and their derivatives. **Polysaccharide Carriers for Drug Delivery**, Woodhead Publishing, p. 19 – 48, 2019.

SMITH, L. Disseminated Intravascular Coagulation. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 000, p. 151135, 2021.

SONG, S.; *et al.* Structural characterization and anticoagulant activity of two polysaccharides from *Patinopecten yessoensis* viscera. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 579 – 585, 2019.

TORRI, G.; NAGGI, A. Heparin centenary – an ever-young life-saving drug. **International Journal of Cardiology**, 212S1, S1–S4, 2016.

VILANOVA, E.; TOVAR, A. M. F.; MOURÃO, P. A. S. Imminent risk of a global shortage of heparin caused by the African Swine Fever afflicting the Chinese pig herd. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 17, p. 254 – 256, 2019.

VINAYAGAM, S.; SATTU, K. SARS-CoV-2 and coagulation disorders in different organs. **Life Sciences**, v. 260, p. 118431, 2020.

VITYAZEV, F. V.; *et al.* Synthesis of sulfated pectins and their anticoagulant activity. **Biochemistry**, v. 75, p. 759 – 768, 2010.

WANG, Z.; *et al.* Sulfated modification of polysaccharides: synthesis, characterization and bioactivities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 74, p. 147 – 157, 2018.

XIE, Z.; *et al.* The selectivity and bioavailability improvement of novel oral anticoagulants: An overview. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 299 - 317, 2018.

XU, Y.; *et al.* Chemically modified polysaccharides: synthesis, characterization, structure activity relationships of action. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 970 – 977, 2019.

YANG, J.; *et al.* Preparation, characterization and in vitro anticoagulant activity of highly sulfated chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, p. 25 – 31, 2013.

ZHANG, J.; *et al.* The optimization of sulfation modification conditions for ophiopogonpolysaccharide based on antiviral activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 657 – 662, 2012.

ZHOU, C. L.; *et al.* Isolation, characterisation and sulphation of soluble polysaccharides isolated from *Cucurbita máxima*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 508 – 514, 2014.

ZHU, Y.; *et al.* Purification, in-depth structure analysis and antioxidant stress activity of a novel pectin-type polysaccharide from *Ziziphus Jujuba cv. Muzaoresidue*. **Journal of Functional Foods**, v. 80, p. 104439, 2021.