



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

JULIANA DA COSTA MADEIRA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ANTICOAGULANTE,
ANTIPLAQUETÁRIO E ANTITROMBÓTICO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Genipa
americana* e *Ximenia americana***

FORTALEZA-CEARÁ

2019

JULIANA DA COSTA MADEIRA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ANTICOAGULANTE, ANTIPLAQUETÁRIO
E ANTITROMBÓTICO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Genipa americana* e *Ximenia
americana*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas. Área de concentração: Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Gonçalves Pereira.

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Antônio de Sousa Mourão.

FORTALEZA-CEARÁ

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Madeira, Juliana da Costa.

Caracterização físico-química, anticoagulante, antiplaquetária e antitrombótico dos polissacarídeos de *Genipa americana* e *Ximenia americana* [recurso eletrônico] / Juliana da Costa Madeira. - 2019.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 83 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Fortaleza, 2019.

Área de concentração: Ciências Fisiológicas.

Orientação: Prof.^a Dra. Maria Gonçalves Pereira.

Coorientação: Prof. Dr. Paulo Antônio de Sousa Mourão.

1. Polissacarídeos de vegetais. 2. Purificação. 3. Ácido urônico. 4. Coagulação sanguínea. 5. Hemostasia. I. Título.

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ANTICOAGULANTE, ANTIPLAQUETÁRIO
E ANTITROMBÓTICO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Genipa americana* e *Ximenia
americana*

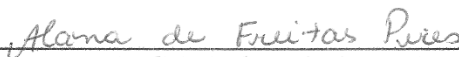
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas. Área de concentração: Ciências Fisiológicas.

Aprovado em: 25 de junho de 2019.

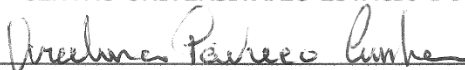
BANCA EXAMINADORA



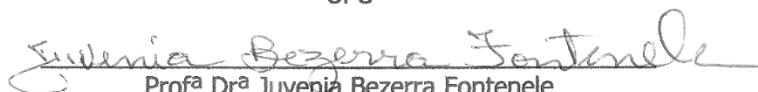
Prof^ª Dr^ª Maria Gonçalves Pereira
Orientadora - UECE



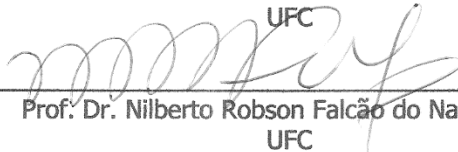
Prof^ª Dr^ª Alana de Freitas Pires
CENTRO UNIVERSITÁRIO ESTÁCIO DO CEARÁ



Prof^ª Dr^ª Arcelina Pacheco Cunha
UFC



Prof^ª Dr^ª Juvénia Bezerra Fontenele
UFC



Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
UFC

Aos meus pais, Glaybe e Madeira, e meu marido, João Dennys, por essa conquista e alegrias multiplicadas.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Pereira, pela orientação e apoio nos trabalhos científicos, contribuindo para o desenvolvimento da linha de pesquisa em coagulação e trombose no PPGCF.

À Profa. Dra. Ana Maria Assreuy, pelo exemplo de pesquisadora e professora, incentivando e buscando o crescimento científico dos alunos e do grupo.

Ao Prof. Dr. Paulo Mourão (UFRJ) e seu grupo do Laboratório de Tecido Conjuntivo, destacando-se Gustavo, Ismael, Bruno, Kátia, Paulo, Nina e Profa Ana Tovar, pela acolhida, colaboração e ensinamentos.

À Profa. Alana Pires, pela amizade, conselhos e força para a busca de conhecimentos. Aos convidados para as bancas de qualificação e de defesa, Profa Juvenia, Profa Arcelina, Prof Gislei, Prof Ismael e Prof Nilberto, pelas considerações realizadas para o engrandecimento deste estudo.

Às amigas fortalecidas no laboratório, Gabi, Pedro, Kaira, Polly, Beatriz, Timna, Livinha, Cléo e Lucas, pela companhia, suporte, incentivo e discussão das nossas pesquisas dentro e fora da UECE.

Aos demais colegas do LAFFIN e aos alunos de IC Gabriel e Camila, pela convivência e apoio no nosso grupo, apesar do curto período.

Aos alunos do LAPOBIO, em especial a Samira, Josenildo e Luis Afonso, pela dedicação e apoio durante a obtenção dos polissacarídeos das plantas *Ximenea americana* e *Genipa americana*.

À Profa Arcelina Pacheco (UFC) pelo apoio na caracterização estrutural.

Aos doadores do Centro de Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) pela autorização na doação de sangue para a realização dos protocolos *in vitro*.

Aos funcionários do HEMOCE, em especial a Cássia, pela recepção na Instituição e ajuda nas coletas.

À Debora Fernandes, pelo companheirismo e amizade simples e verdadeira.

Aos amigos externos ao laboratório, destacando-se Ivana e Clarisse, grandes parceiras.

Ao Cleidson, pelo cuidado com os animais.

Aos funcionários do ISCB.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

À FUNCAP pelo apoio financeiro no desenvolvimento desse estudo.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes”. (Cora Coralina)

RESUMO

O número crescente de casos envolvendo doenças tromboembólicas tem ampliado a necessidade do uso de fármacos com atividade anticoagulante e antiplaquetária. Porém, eventos adversos estão associados ao seu uso, incluindo risco de sangramento, alterações gastrointestinais e risco de reincidência de distúrbios vasculares. Estudos da atividade dos polissacarídeos de plantas na coagulação e agregação plaquetária tem mostrado efeitos promissores, sendo o efeito anticoagulante atribuído à presença de ácido urônico na estrutura do polímero. Este trabalho objetivou purificar, caracterizar química-estruturalmente os polissacarídeos das folhas de *Genipa americana* e cascas de *Ximenia americana* e avaliar os seus efeitos e mecanismos de ação na coagulação sanguínea e agregação plaquetária, e na trombose venosa e tendência hemorrágica em ratos. Os glicoconjugados extraídos das folhas de *G. americana* (EP-Ga) foram separados em duas frações, PFI (36% carbohydrate, including 9% uronic acid, 4% proteins and 0.77 mg/g polyphenols) e PFII (23% carbohydrate, including 30% uronic acid, 5% proteins and 0.81 mg/g polyphenols), compostas principalmente por arabinose, galactose e ácido urônico, apresentando massas moleculares polidispersas (~16 kDa) por eletroforese em gel de poliacrilamida e GPC. Durante FT-IR (1410 e 1333 cm^{-1}) e RMN (α -GalpA) também detectaram a presença de resíduos de ácido urônico. A desproteínização dos glicoconjugados mostrou níveis reduzidos de proteínas e polifenóis, porém com perda de seus efeitos anticoagulante e antiplaquetário. O EP-Ga e PFII prolongaram o tempo de coagulação em 3,6 e 1,8x (TTPA), enquanto EP-Ga e PFI inibiram em 48% (100 $\mu\text{g/mL}$) a agregação plaquetária induzida pelo ADP. Após tratamento diário por via oral (7 dias: 1 mg/Kg) com PFI e PFII de *G. americana*, 1 h após o tratamento, nos dias 1, 3 e 7, foi obtido o plasma dos ratos que foram avaliados pelo teste do TTPA (via intrínseca da coagulação), prolongando o tempo de coagulação em 5,5x, e quanto a agregação plaquetária induzida por ADP, inibindo em 46%. Ambos PFI e PFII diminuíram a formação de trombos em 33% e 28%, respectivamente, sem alteração no tempo de sangramento, mostrando uma vantagem em relação ao ácido acetilsalicílico ou varfarina, que aumentaram o tempo de sangramento em 3,6 e 2,9x, respectivamente. Os polissacarídeos extraídos das cascas de *X. americana*, proteinados (EP-Xa) e desproteínados (EPd-Xa) foram separados em quatro frações por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose), denominadas PFI, PFId, PFII e

PFIId (carboidrato total: 21,5-44,4%/ácido urônico: 5,2-25,0%; proteína: 0,6-2,4%, polifenóis: 0,78-4,6 mg/g). Estruturalmente, apresentaram baixos pesos moleculares (eletroforese em gel de poliacrilamida e GPC: 79,8-120,5 kDa) e presença de ácido urônico (FT-IR: 1623-1637 e 1405-1426 cm^{-1}) e α -GalpA (RMN). O EPd-Xa e FIId prolongaram o tempo de coagulação em até 4,2 e 1,3x (TTPA), enquanto somente a PFI inibiu a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico em 28,2%. *In vivo*, os polissacarídeos (1 mg/Kg) inibiram a formação de trombo venoso de 57-66% e não modificaram o tempo de sangramento. Após desproteinização, o PEd-Xa manteve os efeitos anticoagulante e antitrombótico. Em conclusão, os glicoconjugados ricos em arabinogalactana, contendo proteínas e polifenóis, das folhas de *G. americana* e os polissacarídeos das cascas de *X. americana*, contendo ácido urônico, apresentam efeitos antiplaquetário, anticoagulante (via intrínseca/comum) e antitrombótico, com baixo risco hemorrágico. Estes resultados trazem novas possibilidades terapêuticas para doenças de natureza tromboembólicas.

Palavras-chave: Polissacarídeos de vegetais. Purificação. Ácido urônico. Coagulação sanguínea. Hemostasia. Trombose.

ABSTRACT

The growing number of cases involving thromboembolic diseases has increased the need for the use of anticoagulant and antiplatelet drugs. However, adverse events are associated with its use, including risk of bleeding, gastrointestinal reactions and risk of recurrence of vascular disorders. The investigation of polysaccharide activity of higher plants in coagulation and platelet aggregation has shown promising effects, being attributed to the presence of uronic acid in its structure. This work aimed to purify, characterize chemically-structurally the polysaccharides from *Genipa americana* leaves and *Ximenia americana* barks and to evaluate their effects and mechanisms in blood coagulation and platelet aggregation, venous thrombosis and hemorrhagic tendency in rats. Glycoconjugates extracted from *G. americana* leaves (PE-Ga) were separated into two fractions, denominated as PFI and PFII (total carbohydrate: 23-36%/uronic acid: 9-30%; protein: 4-5%; polyphenols: 0.776-0.812 mg/g), mainly composed by arabinose, galactose and uronic acid and showing polydisperse molecular weights (~16 kDa) by polyacrylamide gel electrophoresis and GPC. FT-IR (1410 and 1333 cm^{-1}) and NMR (α -GalpA) also detected the presence of uronic acid residues. Deproteinization of glycoconjugates showed reduced protein and polyphenol levels with loss of its biological effects. PE-Ga and PFII prolonged clotting time-aPTT (3.6 and 1.8 x), while PE-Ga and PFI inhibited by 48% (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) the ADP-induced platelet aggregation. After daily *per oral* treatment (7 days: 1 mg / kg) with PFI or PFII of *G. americana*, 1 h after treatment on days 1, 3 and 7, plasma of rats was obtained and evaluated by the APTT (intrinsic coagulation pathway), prolonged in 5.5 fold, and for platelet aggregation induced by ADP, inhibiting in 46%. Both PFI and PFII prevented thrombus formation by 33% and 28%, respectively, without change in bleeding time, showing an advantage over acetylsalicylic acid or warfarin, which increased the bleeding time by 3.6 and 2.9 fold, respectively. Polysaccharide extracted from *Ximenia americana* barks (PE-Xa) were deproteinated (PEd-Xa) and separated into four fractions, denominated as PFI, PFId, PFII and PFIIId (total carbohydrate: 21.5-44.4%/uronic acid: 5.2-25.0%; protein: 0.6-2.4%; polyphenols: 0.78-4.6 mg/g). Structurally, it presented low molecular weight (polyacrylamide electrophoresis gel and GPC: 79.8-120.5 kDa), contained uronic acid (FT-IR: 1623-1637 and 1405-1426 cm^{-1}) and α -GalpA (NMR). PEd-Xa and FIIId prolonged clotting time by up to 4.2 and 1.3x (aPTT), while only PFI inhibited arachidonic acid-induced platelet aggregation in

28.2%. *In vivo*, polysaccharides (1 mg/Kg) inhibited venous thrombus formation of 57-66% and did not modify bleeding time. After deproteinization, EPd-Xa maintained the anticoagulant and antithrombotic effects. In conclusion, the glycoconjugates rich in arabinogalactan, containing proteins and polyphenols, of *G. americana* leaves and the polysaccharides of *X. americana* barks, containing uronic acid, present antiplatelet, anticoagulant (intrinsic/common) and antithrombotic, with low hemorrhagic risk. These results bring new therapeutic possibilities for diseases of the thromboembolic nature.

Keywords: Plant polysaccharide. Purification. Uronic acid. Coagulation. Hemostasis. Thrombosis.