

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DA
GLUCURONOMANANA DE *Vochysia tucanorum*****EVALUATION OF THE ANTICOAGULANT ACTIVITY OF
GLUCURONOMANNAN OF *Vochysia tucanorum***Daiane Santos Batista¹Ricardo Wagner²**RESUMO**

Os polissacarídeos de origem vegetal são uma importante classe de produtos naturais bioativos, que podem apresentar diversas atividades biológicas, dentre elas a atividade anticoagulante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anticoagulante da glucuronomanana de *Vochysia tucanorum* e seu derivado hidrolisado. A atividade anticoagulante foi determinada *in vitro* através de testes tempo de tromboplastina parcial ativado (APTT) e tempo de protrombina (PT), usando plasma de coelho liofilizado citratado comparado com a heparina padrão. O polissacarídeo nativo foi submetido à hidrólise parcial (1M TFA, 100°C, 4h) para remoção de cadeias laterais e obtenção da cadeia principal. O derivado hidrolisado aumentou o tempo do teste APTT nas doses de 500 e 1000 µg/mL, quando comparado ao grupo controle, sugerindo sua ação sobre a via intrínseca da cascata de coagulação. Pelos dados obtidos o polissacarídeo nativo não apresentou atividade anticoagulante. A glucuronomanana hidrolisada por apresentar unidades de ácido urônico mais expostas tem maior interação com a trombina, em comparação com o polissacarídeo nativo, onde as cargas negativas são obstruídas pelas cadeias laterais.

Descritores: Polissacarídeo, *Vochysia tucanorum*, atividade anticoagulante.

ABSTRACT

Plant polysaccharides are an important class of bioactive natural products, which can present various biological activities, among them the anticoagulant activity. The aim of this study was to evaluate the anticoagulant activity of

glucuronomanan *Vochysia tucanorum* and its hydrolyzate derivative. The anticoagulant activity was determined *in vitro* by testing activated partial thromboplastin time (APTT) and prothrombin time (PT), using rabbit lyophilized citrated plasma compared with standard heparin. The native polysaccharide was submitted to partial hydrolysis (1M TFA, 100 °C, 4h) for removal of side chains and obtain the main chain. The hydrolyzated derivative increased the time of the APTT test at doses of 500 and 1000 µg /mL, compared with the control group, suggesting its action on the intrinsic pathway of coagulation cascade. Data obtained by the native polysaccharide showed no anticoagulant activity. The glucuronomanan hydrolyzed have more units of uronic acid exposed has and it can interact more effective with thrombin, in comparison with the native polysaccharide, where the negative charges are obstructed by the side chains.

Keywords: Polysaccharide, *Vochysia tucanorum*, anticoagulation activity.

INTRODUÇÃO

Segundo WHISTLER (1973), gomas são produtos do metabolismo secundário de vegetais superiores, que contém moléculas hidrofílicas ou hidrofóbicas de alta massa molar que possuem propriedades coloidais ⁽¹⁾. As gomas de origem vegetal são o produto do metabolismo fisiológico basal ou resposta patológica oriunda de ação mecânica ou de microorganismos parasitas. Além disso, o processo de produção da goma, a “gomose” pode estar relacionada à adaptação vegetal mediante as alterações climáticas ^(2,3,4).

As gomas (hidrocolóides) também podem ser definidas de forma geral como qualquer polissacarídeo solúvel em água, extraído de vegetais terrestres, marinhos ou de microorganismos, que possuam a capacidade de aumentar a viscosidade ou formar géis ⁽⁵⁾.

Cerca de 10 a 15% do total de gomas naturais, são de origem vegetal e apresentam ampla aplicação industrial, tanto alimentícia como farmacêutica e cosmética ⁽⁶⁾. Os polissacarídeos de origem vegetal são uma importante classe de produtos naturais bioativos, que podem apresentar atividades biológicas como: atividades antitumorais, imunoestimulantes, anticomplementos, antiinflamatórias, anticoagulantes e antivirais ⁽³⁾.

A atividade anticoagulante de alguns polissacarídeos pode ser atribuída à presença de grupamentos sulfatos e as carboxilas dos ácidos urônicos, que conferem a estrutura alta densidade de cargas negativas, e assegura sua atividade ⁽⁷⁾.

A glucuronomanana é um polissacarídeo encontrado na goma de *Vochysia tucanorum* Mart., conhecida popularmente como pau-de-tucano, vinheiro-do-mato, pau-de-vinho é uma espécie pertencente à família Vochysiaceae, que se apresenta em áreas de transição entre o cerrado a mata atlântica, distribuídas no Brasil, desde a Bahia até o Estado do Paraná ^(8,9).

Esse polissacarídeo possui uma unidade repetitiva da cadeia principal formada por $\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow). Nesta cadeia encontram-se substituições na posição O-3, nas unidades de manose e ácido glucurônico, que apresentam muitas cargas negativas ⁽⁹⁾. Sabe-se que um dos possíveis mecanismos para ação anticoagulante é por ligação iônica, que ocorre entre as cargas negativas da antitrombina e as cargas positivas da trombina ^(10,11).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anticoagulante da glucuronomanana de *V. tucanorum*, através de testes *in vitro*, visto a análise estrutural do polissacarídeo da *V. tucanorum* e sua possível atividade biológica.

METODOLOGIA

Reagentes

Heparina de mucosa intestinal de suíno (5000 UI) foi adquirida da Heparinan, tromboplastina de cérebro de coelho e os reativos para determinar o APTT e PT (LABTEST), plasma de coelho citratado liofilizado (NEWPROV[®]). Os demais reativos empregados foram de grau analítico.

Glucuronomanana de *Vochysia tucanorum*

A glucuronomanana proveniente da goma da *Vochysia tucanorum*, foi obtida em colaboração com Prof. Dr. Ricardo Wagner. Após hidrólise parcial o seu derivado foi estudado quanto às propriedades anticoagulantes *in vitro*.

Hidrólise parcial

A hidrólise do polissacarídeo nativo da *V. tucanorum* foi realizada com a finalidade de remover cadeias laterais, e obter a cadeia principal. Para tanto, foram adicionados 10 ml TFA (ácido trifluoracético) 1M em 1,0 g do polissacarídeo nativo, o qual foi submetido a 100°C por 4 horas.

Posteriormente o material obtido foi neutralizado com NaOH e dialisado em membrana de 8.000 Da contra água corrente e, em seguida, liofilizado.

Análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN-¹³C)

Os espectros de RMN-¹³C foram obtidos pelo uso de espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE-DRX-400, incorporados a transformador de Fourier, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

As amostras foram solubilizadas em óxido de deutério (D₂O), e colocadas em tubos de 15 cm de comprimento e com 5 mm de diâmetro. As análises foram realizadas a 50- 70°C, e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, utilizando como padrão externo a acetona P. A. (δ 30,2).

Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectroscopia de massa (GC-MS)

A cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectroscopia de massa foi realizada em cromatógrafo VARIAN, modelo Saturn 2000R- 3800 *gas chromatography* acoplado a um detector de massa VARIAN, modelo Saturn 2000R - *mass spectroscopy detector Ion Trap*. A coluna utilizada foi a coluna capilar de sílica fundida DB-225 (30 m x 0.25 mm d.i. x 0,25 μ m de espessura de filme), no Departamento de Bioquímica e Biologia Celular da UFPR.

Foi utilizado Hélio ultrapuro com gás de arraste, a um fluxo de 1,5 mL/mim. A temperatura inicial da coluna foi mantida a 50°C por 0,1 minuto, seguido pela elevação gradativa da mesma até 220°C, numa taxa de 40°C, sendo mantida isotermicamente até o final da análise por 25 minutos. Esta programação foi utilizada para a análise dos alditóis acetatos.

Testes anticoagulantes *in vitro*

Os testes de atividade anticoagulante dos polissacarídeos nativos e hidrolisado foram realizados no coagulômetro Quick Time II da marca Drake.

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT)

Este ensaio foi realizado com os polissacarídeos: nativo e hidrolisado e heparina padrão, os quais foram diluídos em salina em diversas concentrações. Plasma de coelho liofilizado reconstituído em água deionizadas (100 μ l) foi misturado com 50 μ l de soluções em diferentes concentrações de polissacarídeo nativo e hidrolisado e heparina. Para controle, salina foi adicionada ao plasma em uma razão de 1:10.

Para a determinação do APTT, os plasmas contendo os polissacarídeos e heparina, a serem testados foram incubados separadamente a 37°C por 1 minuto, em seguida adicionou-se 100 µl de ácido elágico e a incubação persistiu por mais 3 minutos a 37°C, decorrido este tempo adicionou-se cloreto de cálcio (CaCl₂) 20mmol/L e o tempo de coagulação foi determinado. O tempo de coagulação foi medido em triplicata. O tempo máximo de ensaio foi 240 segundos, os resultados foram expressos em µg de polissacarídeo/ml de plasma e o tempo de coagulação em segundos.

Tempo de Protrombina (PT)

Para a determinação do PT, os plasmas contendo os polissacarídeos e heparina, a serem testados foram incubados separadamente a 37°C por 1 minuto, decorrido este tempo adicionou-se 200 µl de tromboplastina cálcica de cérebro de coelho. O tempo para o aparecimento do coágulo de fibrina foi medido em triplicata. O tempo máximo de ensaio foi 140 segundos, os resultados foram expressos em µg de polissacarídeo/ml de plasma e o tempo de coagulação em segundos.

Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA, e na sequência o teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo, utilizando software Prisma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de eliminar as cadeias laterais e obter a cadeia principal o polissacarídeo nativo da *V. tucanorum* foi submetido à hidrólise parcial com TFA (1M, 100°C durante 4 h). Em seguida, o produto obtido foi neutralizado com NaOH até obter pH = 5 - 6 e dialisado em membrana de 8.000 Da contra água corrente e, posteriormente liofilizado.

O derivado hidrolisado bem como o polissacarídeo nativo foram solubilizados em água deuterada (D₂O), e tiveram seus espectros de RMN- ¹³C definidos para análise da estrutura química (FIGURA 1, 2).

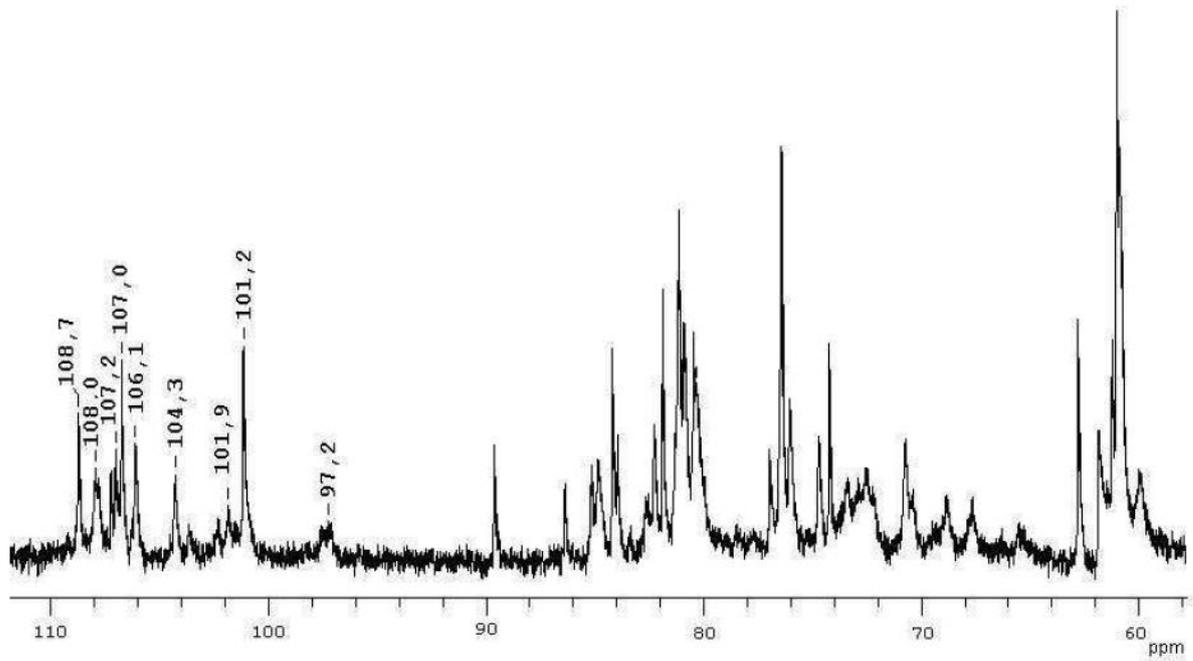


Figura 1: Espectro de RMN-¹³C do polissacarídeo nativo. Análise realizada com probe de 5 mm, 50° C, em D₂O. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.

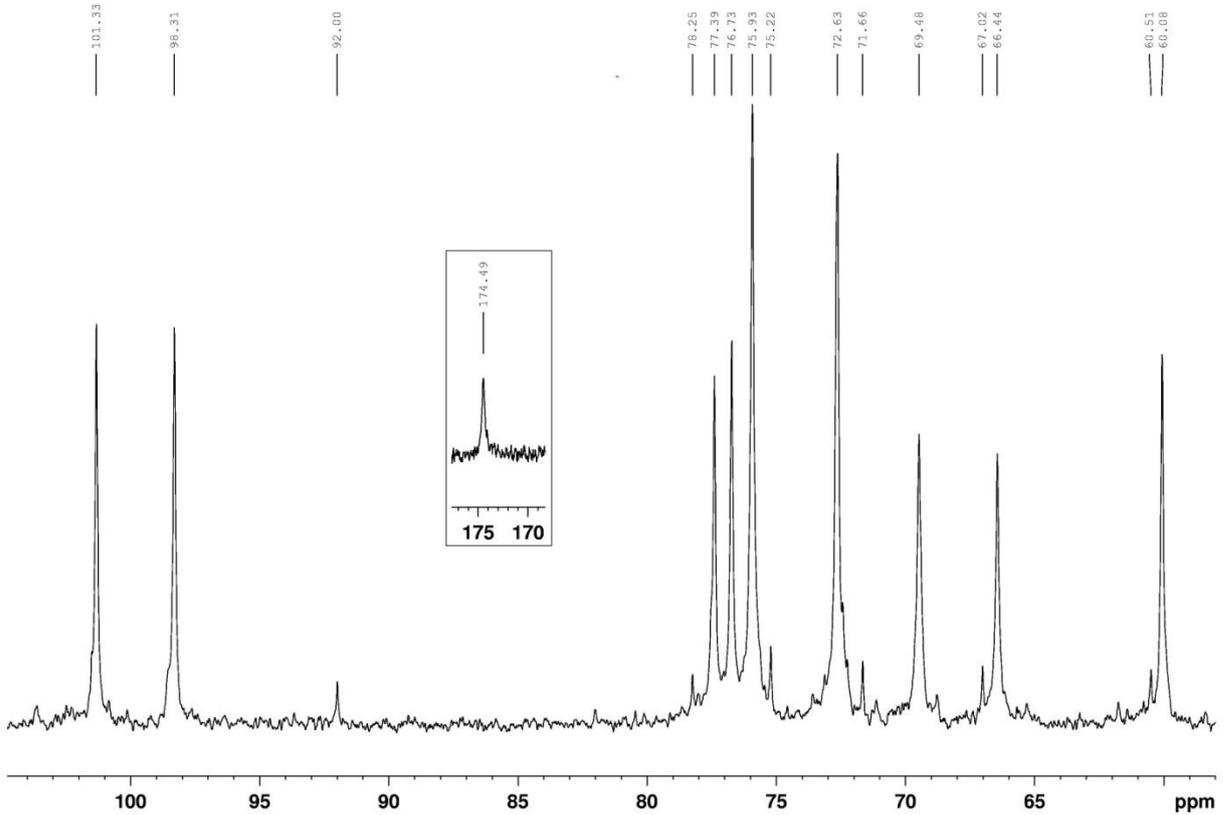


Figura 2: Espectro de RMN-¹³C obtido após hidrólise parcial. Análise realizada com probe de 5 mm, 50° C, em D₂O. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm.

Como observa-se na Figura 1, existem muitos sinais na região de C-1, dentre os quais destacam-se os sinais na faixa de δ 108,7 a 106,1, referentes a unidades de α -L-Araf⁽¹⁴⁾. O sinal em δ 104,3 que pode ser atribuído às unidades de β -D-Galp 3-O substituídas⁽¹⁵⁾. E o sinal em δ 101,2 sugere as unidades de β -D-GlcpA 4-O substituídas⁽¹⁶⁾. Pode-se observar ainda na figura 2 um sinal em δ 174,4, referente ao CO₂H-6 das unidades dos ácidos urônicos⁽⁸⁾.

Com o objetivo de se chegar à cadeia principal, o polissacarídeo nativo foi submetido a hidrólise parcial (TFA 1M, 100°C durante 4 h) e teve sua composição monossacarídica determinada. Os resultados encontrados estão mostrados na Figura 2 e na Tabela 1. Pode-se observar na análise de RMN-¹³C do polissacarídeo hidrolisado, um espectro com apenas dois sinais principais na região de carbono anomérico. Sendo o sinal em δ 98,3 referentes às unidades de α -D-Manp substituídas em O-2 e o sinal em δ 101,3 correspondente às unidades de β -D-GlcpA substituídas em O-4 e de modo alternado e repetitivo. O sinal em δ 92 corresponde à extremidade redutora de α -D-Manp.

A composição monossacarídica do polissacarídeo hidrolisado demonstra que houve remoção de todas as unidades de arabinose, e diminuição das unidades de galactose, restando apenas 4%, ainda com presença de manose (39%), glucose (18%) e ácido urônico (39%) conforme Tabela 1. A presença de glucose pode ser resultante do processo de redução das unidades de ácido glucurônico em glucose com NaBH₄.

Tabela 1- Composição monossacarídica das frações obtidas do polissacarídeo nativo e hidrolisado.

	Frações (%)	
	Nativo	Hidrolisado
Arabinose	44	-
Manose	5	39
Galactose		4

	18	
Glucose	2	18
Ácido urônico*	31	39

* O teor de ácido urônico foi determinado pelo método de FILISETTI- COZZI e CARPITA, 1991.

Testes de atividade anticoagulantes *in vitro*

Os testes que avaliam o potencial anticoagulante dos polissacarídeos *da V. tucanorum* foram APTT (tempo de tromboplastina parcial ativado) e PT (tempo de protrombina), sendo usado como padrão de referência a heparina.

O tempo de tromboplastina parcial ativado (APTT) baseia-se na ativação do mecanismo intrínseco da coagulação sanguínea. O APTT é a melhor prova para investigar as alterações do mecanismo da coagulação sanguínea especialmente as deficiências envolvendo os fatores que participam do sistema intrínseco da coagulação, como os fatores VIII e IX. Já o teste tempo de protrombina (PT) é a prova de escolha para a investigação do sistema extrínseco da coagulação, permitindo revelar deficiências dos fatores que fazem parte dessa via ⁽⁶⁾.

Os estudos que avaliam a atividade anticoagulante são iniciados com testes *in vitro* utilizando pelo menos um dos testes citados acima. Dessa forma, a realização desses testes definiria em qual das vias da cascata de coagulação o polissacarídeo em estudo poderia atuar. Na Tabela 2 estão compilados os resultados do polissacarídeo nativo, hidrolisado e heparina padrão sobre os testes APTT e PT.

De acordo com os resultados obtidos, o polissacarídeo hidrolisado foi capaz de aumentar o tempo do teste APTT apenas nas doses de 500 e 1000 µg/mL do plasma (Figura 5). Entretanto, sua atividade anticoagulante foi inferior a heparina padrão (Figura 6). Já o polissacarídeo nativo não foi capaz de interferir em nenhuma das vias da cascata de coagulação, não apresentando atividade anticoagulante (Figura 3-4).

O prolongamento do tempo de tromboplastina parcial ativado (ATPP) sugere que o polissacarídeo em estudo atua sobre a via intrínseca da cascata de coagulação em um ou mais componentes dessa via ⁽¹²⁾. Observou-se

também que nenhuma concentração foi capaz de prolongar o teste de tempo de protrombina (PT) indicando que este polissacarídeo não é capaz de atuar na via extrínseca da coagulação ⁽¹³⁾.

Tabela 2 – Atividade anticoagulante avaliada pelo APTT e PT no plasma de coelho liofilizado contendo glucuronomanana nativa, hidrolisada e heparina.

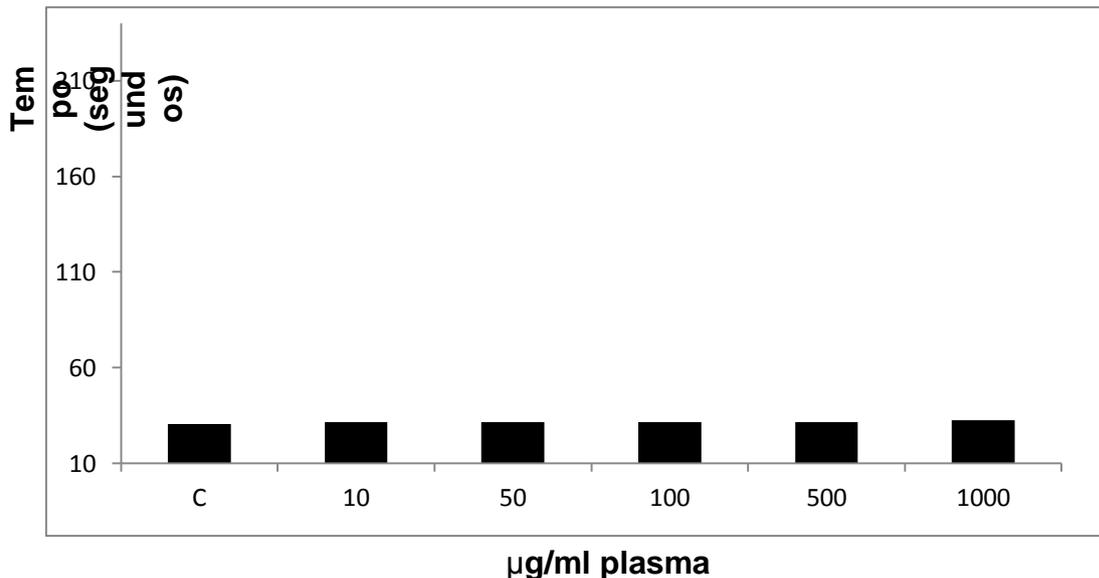
Derivado	APTT		PT	
	$\mu\text{g ml}^{-1}$ plasma	Tempo (segundos)	$\mu\text{g ml}^{-1}$ plasma	Tempo (segundos)
Nativo	0	30,5 ± 0,06	0	15,4 ± 0,7
	10	31,6 ± 0,4	10	16,7 ± 0,1
	50	31,4 ± 0,1	50	17,0 ± 0,8
	100	31,7 ± 0,4	100	17,0 ± 0,8
	500	31,6 ± 0,7	500	17,0 ± 0,8
	1000	32,4 ± 0,4	1000	17,4 ± 0,4
Hidrolisado	10	32,0 ± 0,5	10	15,8 ± 0,2
	50	32,0 ± 0,3	50	16,3 ± 0,2
	100	32,0 ± 0,2	100	17,0 ± 0,7
	500*	36,0 ± 0,6	500	17,2 ± 0,3
	1000*	37,0 ± 0,3	1000	17,4 ± 0,4
Heparina	2*	134,6 ± 4,8	2	17,2 ± 0,6
	4*	240 ± 0	4	18,4 ± 0,8
	6*	240 ± 0	6	21,4 ± 0,4

O tempo de coagulação foi medido em triplicata para cada concentração testada usando um coagulômetro (Quick Time - Drake). * Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Como já citado o polissacarídeo hidrolisado apresentou um prolongamento no APTT nas doses de 500 e 1000 $\mu\text{g/ mL}$ plasma (Figura 5) não atingindo valores maiores que a heparina padrão, que apresentou prolongamento máximo de 240 segundos no teste APTT, nas doses de 4 e 6 $\mu\text{g/ mL}$. (Figura 6).

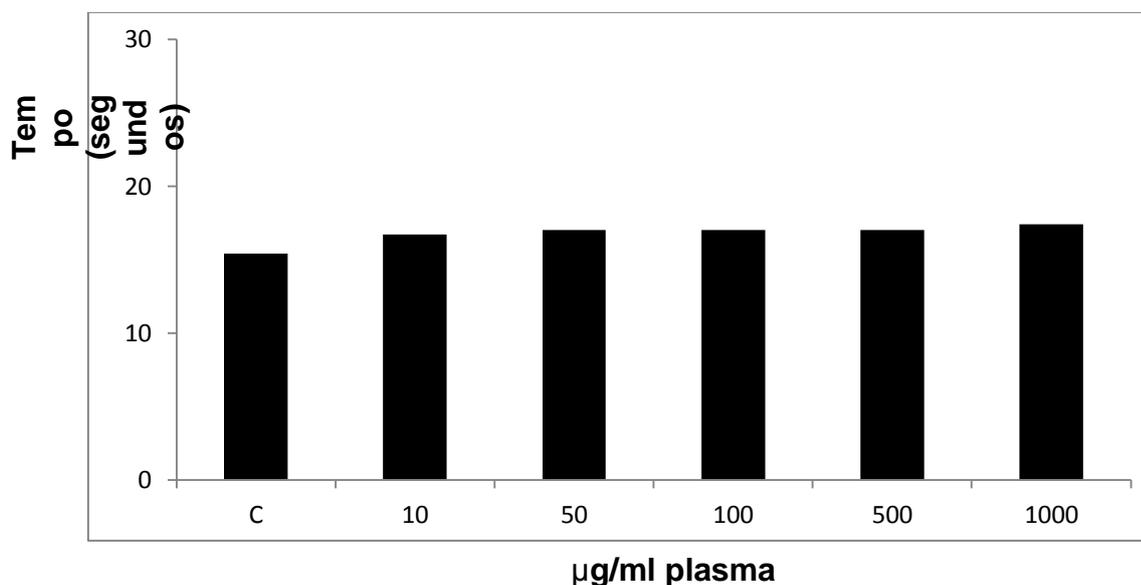
No teste PT não foi observado prolongamento quando utilizado o polissacarídeo hidrolisado (Figura 7). Porém a heparina padrão apresentou um discreto prolongamento no tempo de protrombina na dose de 6 $\mu\text{g/ mL}$, sugerindo uma baixa atividade na via extrínseca da cascata de coagulação (Figura 8).

Figura 3 – Atividade anticoagulante avaliada pelo APTT no plasma de coelho liofilizado contendo polissacarídeo nativo



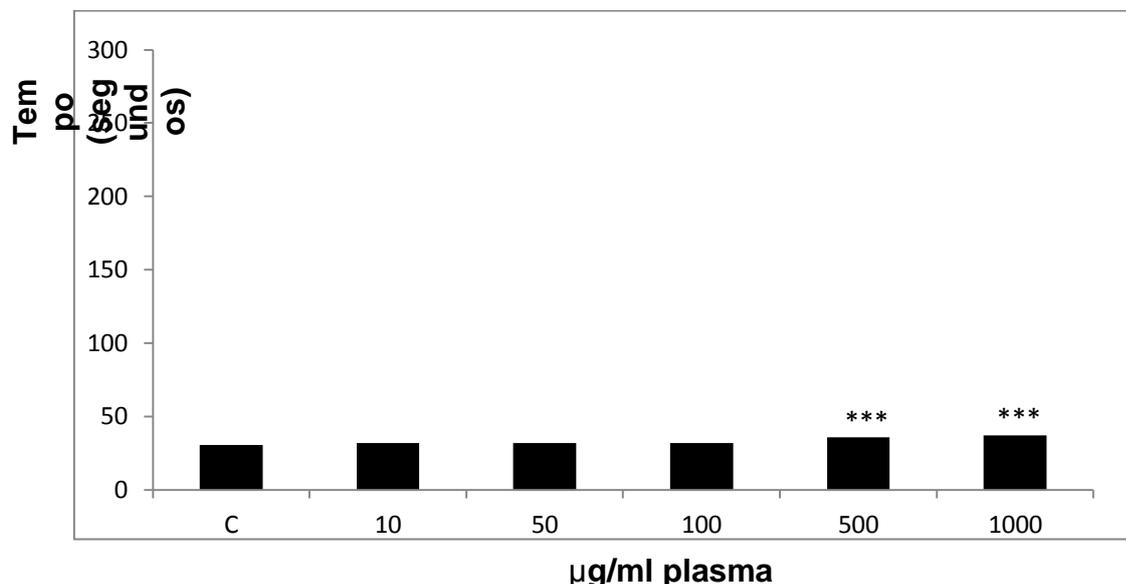
O tempo de coagulação foi medido em triplicata, para cada concentração testada usando um coagulômetro (Quick Time II – Drake). Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Figura 4 - Atividade anticoagulante avaliada pelo PT no plasma de coelho liofilizado contendo polissacarídeo nativo



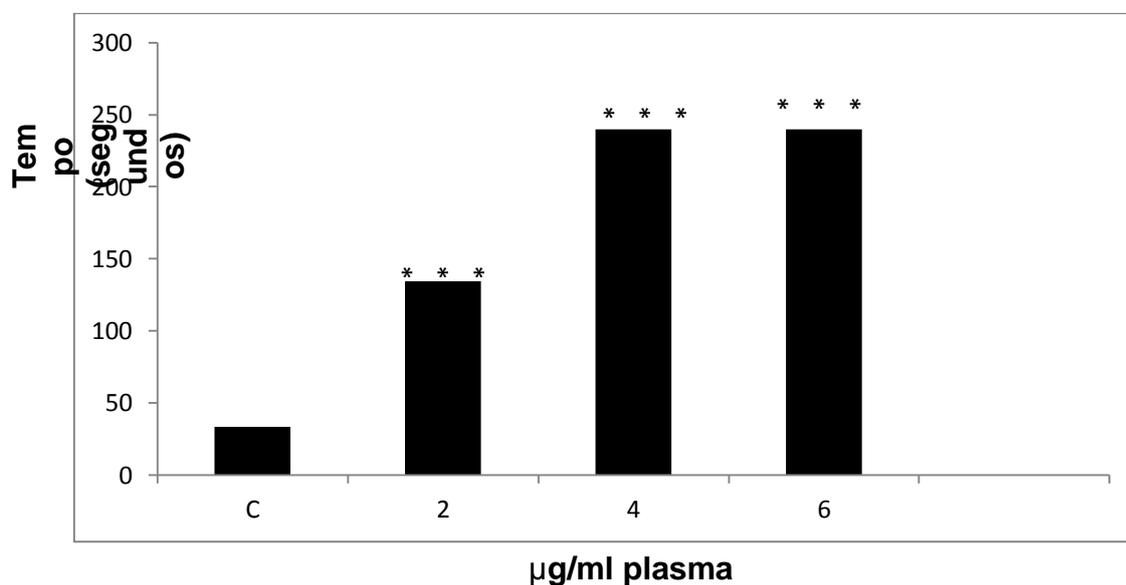
O tempo de coagulação foi medido em triplicata, para cada concentração testada usando um coagulômetro (Quick Time II – Drake). Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Figura 5 - Atividade anticoagulante avaliada pelo APTT no plasma de coelho liofilizado contendo polissacarídeo hidrolisado



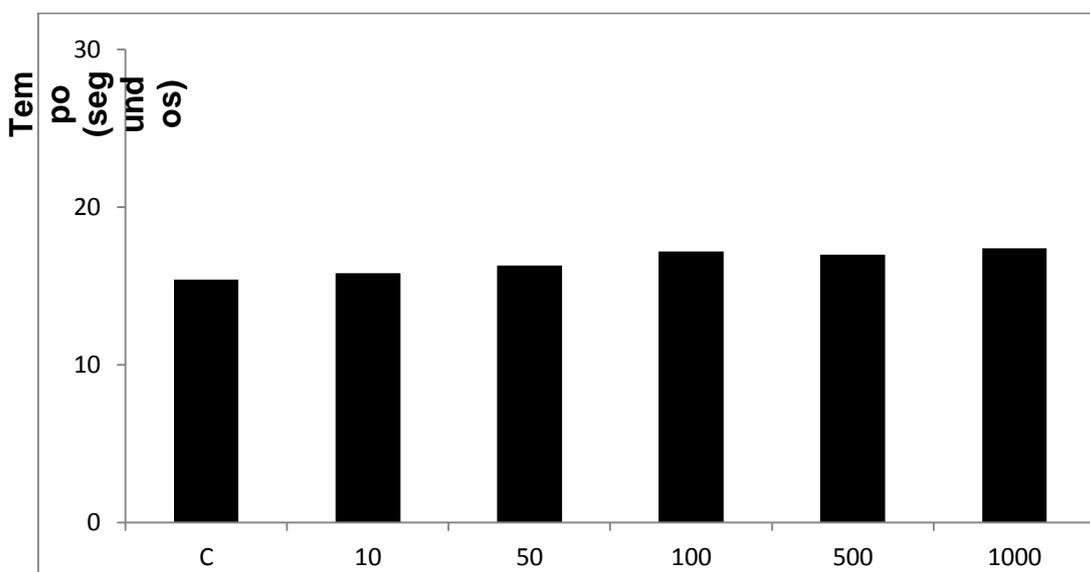
O tempo de coagulação foi medido em triplicata, para cada concentração testada usando um coagulômetro (Quick Time II – Drake). Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Figura 6 - Atividade anticoagulante avaliada pelo APTT no plasma de coelho liofilizado contendo heparina



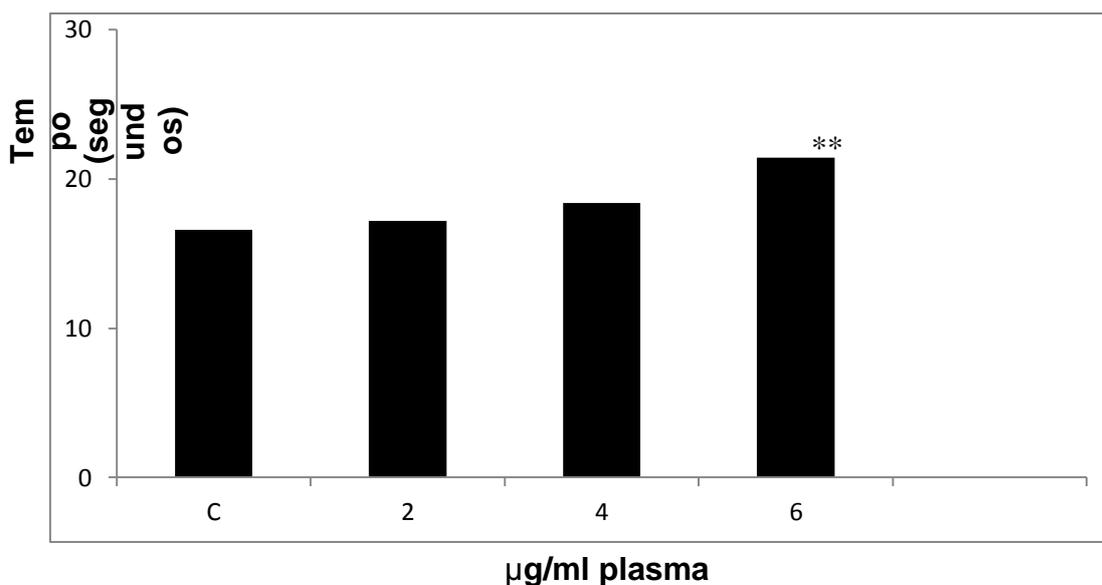
Heparina padrão (140 USP/mg). O tempo de coagulação foi medido em triplicata e para cada concentração testada usando um coagulômetro (Quick Time II – Drake). * Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Figura 7 - Atividade anticoagulante avaliada pelo PT no plasma de coelho liofilizado contendo polissacarídeo hidrolisado



O tempo de coagulação foi medido em triplicata e para cada concentração testada usando um coagulômetro (Quick Time II – Drake).* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Figura 8. Atividade anticoagulante *in vitro* da glucuronomanana de *Vochysia tucanorum* em plasma de teste liofilizado contendo heparina



Heparina padrão. O tempo de coagulação foi medido em triplicata e para cada concentração testada usando um coagulômetro (Quick Time II – Drake).* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

CONCLUSÃO

A glucuronomanana de *Vochysia tucanorum* apresentou atividade anticoagulante *in vitro* na sua forma hidrolisada, sendo capaz de prolongar o tempo de tromboplastina parcial ativado (APTT) nas doses de 500 e 1000 µg/mL, sugerindo que a molécula atua em um ou mais componentes da via

intrínseca da coagulação sanguínea. Sua ação anticoagulante é resultante da alta densidade de cargas negativas produzidas pelo ácido urônico.

REFERÊNCIAS

- 1- Whistler RL. Factors influencing gum costs and applications. In: WHISTLER, RL, BEMILLER JN. (eds.). Industrial gums: polysaccharides and their derivatives. 2 ed. New York: Academic Press; 1973. p. 5-18.
- 2- Poser GL. Polissacarídeos. In: Simões MOS, Schenkel EP, Gosman G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade / UFRGS / Ed. da UFSC; 2000. p. 417-432.
- 3- Tosin FFS. Polissacarídeos da goma de exsudato e da polpa dos furtos de *Prunus persica*: Caracterização estrutural e análises reológicas [tese doutorado]. Curitiba (PR). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- 4- Simões MOS, Schenkel EP, Gosman G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR.. Farmacognosia – da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.
- 5- Fennema OR. Food Chemistry. 3th Edition, New York: Marcel Dekker, 1996.
- 6- Lima AC, Santos RA, Almeida FAG, Bandeira CT. Estimulantes químicos na extração da goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.). Ciência Rural 2001; 31(3): 409-15.
- 7- Martinichen JC. Propriedades anticoagulantes e antitrombóticas de polissacarídeos quimicamente sulfatados de líquens [tese doutorado]. Curitiba (PR). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- 8- Wagner R, Simas FF, Pereira GCZ, Angeli A, Brito JO, Barreira SMW, Delgobo CL, Sasaki GL, Iacomini M, Gorin PAJ. Structure of a

glycoglucuronomannan from the gum exudate of *Vochysia tucanorum* (family Vochysiaceae). Carbohydrate Polymers 2007; 69: 512-21.

9- Gonçalves DJP, Romero R, Yamamoto K. Vochysiaceae do complexo serra da canastra, Minas Gerais. 60° Congresso Nacional de Botânica; 2009; Feira de Santana (BA) Brasil.

10- Pomin VH, Mourão PAS. Carboidratos. Ciência Hoje 2006, 35 (233): p. 24-35.

11- Alban SJW, Welzel D, Franz G, Farred J. Anticoagulant and antithrombotic actions of a semisynthetic β -1,3-glucan sulfate. Thromb. Res. 1995, 78 (3): 201-210.

12- Leblond L, Grouix B, Boudreau C, Yang Q, Siddiqui MA, Winocour PD. *In vitro* and *in vivo* properties of bicyclic lactam inhibitors: a novel class of low molecular weight peptidomimetic thrombin inhibitors. Thromb. Res. 2000, 100: 195-209.

13- Yoon SJ, Pereira MS, Pavão MSG, Hwang JK, Pyun YR, Mourão PAS. The medicinal plant *Porona volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. Thromb. Res. 2002, 106: 51-58.

14- Joseleau JP, Chambat G, Vignon M, Barnoud F. Chemical and ^{13}C NMR studies on two arabinans from the inner bark of *Rosa glauca*. Carbohydrate Research, 1977, 58: 165-175.

15- Perlin AS, Casu B. Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of Dglucose-1- ^{13}C . Tetrahedron Letters 1969, 2921-24.

16- Wagner R, Barreira SMW, Iacomini M, Delgobo CL, Pimentel NM, Gorin PAJ. Structure of a glycoglucuronomannan from the lowviscosity gum of *Vochysia lehmannii*. Carbohydrate Polymers 2004, 57: 269-275.