

***Eichhornia crassipes* é fonte de compostos anticoagulantes**

Dayanne Lopes Gomes¹, Juliana Maria Costa Silva², Nednaldo Dantas dos Santos³,
Hugo Alexandre Oliveira Rocha⁴, Edda Lisboa Leite⁴

¹Aluna bolsista PIBIC/CNPq, ²Bióloga, Mestre em Bioquímica, ³Biólogo, Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – UFRN, ⁴Professores Orientadores, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

RESUMO

Polissacarídeos de diversas fontes têm demonstrado atividade anticoagulante. Contudo, há apenas um trabalho que mostra polissacarídeos de plantas com atividade anticoagulante. Usando proteólise e precipitação com metanol, foram obtidos extratos ricos em polissacarídeos de quatro porções vegetativas (raiz, rizoma, folha e pecíolo) da macrófita aquática *Eichhornia crassipes*. Ensaios demonstraram que todos os extratos possuem atividade anticoagulante e que seus sítios de ação se encontram na via intrínseca da coagulação, sendo os extratos de folha os mais potentes. Análises químicas indicaram a presença de polissacarídeos nos extratos, o que nos levou a propor que estes seriam os responsáveis pela atividade dos extratos.

Palavras chave: Polissacarídeos, vegetais superiores, compostos anticoagulantes.

ABSTRACT

Polysaccharides from several sources have been shown to exert anticoagulant activity. However, there is only one report of anticoagulant polysaccharides from plants displaying this activity. Using proteolytic digestion followed by methanol precipitation, we obtained polysaccharide-rich extracts from four distinct parts (root, rhizome, petiole and leaf) of the plant *Eichhornia crassipes*. All extracts showed anticoagulant activity by acting on the intrinsic pathway of the coagulation cascade. Indeed, leaf extracts were the most potent. These results led us to propose that the anticoagulant activity of *Eichhornia crassipes* extracts is mainly dependent on polysaccharide content.

Keywords: Polysaccharides, high plants, anticoagulant compounds.

INTRODUÇÃO

As doenças tromboembolíticas formam um grupo que tem como principal característica o comprometimento do sistema circulatório, do qual fazem parte o coração e vasos sanguíneos. Um fator agravante é que, além de estar entre as principais causas de morte no mundo, a quantidade de casos registrados vem aumentando ao longo dos anos (HIRSH, et al 2002). Não há uma causa única para as doenças tromboembolíticas, e sim, existem fatores que alteram o fluxo normal do sangue e aumentam a probabilidade de sua ocorrência. Pelo menos oito fatores de risco podem ajudar a prever uma doença tromboembolítica: gênero, hereditariedade, idade avançada, diabetes, obesidade, hipertensão arterial sistêmica, sedentarismo e tabagismo (MANSUR et al., 2001).

Nos últimos anos o número de casos envolvendo acidentes vasculares tem aumentado a necessidade do uso de fármacos com atividade anticoagulante e antitrombótica. Esses compostos impedem a formação de coágulos sanguíneos nos vasos. Entretanto, atualmente, há poucos compostos utilizados como anticoagulantes (HIRSH, et al 2002). O principal fármaco anticoagulante é a mucilagem animal, conhecida como heparina. Ela é um polissacarídeo complexo e altamente ativo composto de unidades dissacarídicas formadas por um ácido hexaurônico (ácido glucurônico ou ác. idurônico) e uma glucosamina. Ambos podem exibir substituições em várias posições por íons sulfato e, no caso da glucosamina, há ainda a possibilidade de N-acetilação (NADER et al., 2004). O padrão de substituição nas diferentes moléculas de heparina afeta e controla suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. A heparina foi utilizada como anticoagulante no início dos anos 30, e hoje é o segundo fármaco de origem natural (insulina é o primeiro) mais comercializado no mundo (NADER et al., 2004). Apesar disso, a heparina possui várias limitações: mecanismo de ação muito dependente da antitrombina; necessidade de monitoração do paciente; risco potencial de desenvolvimento de trombocitopenia induzida pela heparina; efeito osteoporótico após uso prolongado; curva de dose-reposta não é dose dependente; não é disponível em apresentações orais (ALBUQUERQUE et al., 2004). Esses e outros fatores justificam os esforços de vários grupos de pesquisadores na busca e desenvolvimento de fármacos anticoagulantes mais potentes e específicos.

Polissacarídeos de outras fontes que não animal vêm sendo avaliados como possíveis anticoagulantes, e aqueles provenientes de macroalgas marinhas vêm se destacando nesse sentido (ROCHA et al., 2006). Por outro lado, apesar da grande quantidade de espécies de vegetais terrestres, há apenas um trabalho que demonstra a presença de polissacarídeos anticoagulantes em vegetais terrestres (YOON et al., 2002).

Eichhornia crassipes é uma planta aquática, flutuante, anual ou perene, nativa da América tropical. O caule flutuante é rastejante e forma estolões. O pecíolo pode ser ocasionalmente inflado. As flores têm pétalas lilases com margem lisa e uma mancha amarela na pétala superior. São dispostas em espigas e flores ocorrem quase o ano todo. Ela se reproduz vegetativamente por estolões e por sementes que são dispersadas pela água e possui capacidade de regeneração muito rápida (GOPAL, 1987). No Brasil é amplamente distribuída, ocorrendo tanto em ecossistemas aquáticos naturais como em ambientes aquáticos impactados por atividades antrópicas. (HENRY-SILVA & CAMARGO, 2000). Este vegetal apresenta diversas aplicabilidades, entre elas o uso no tratamento de efluentes urbanos e de aquíicultura, e algumas vezes é vista como uma praga (PETR, 2000; PIETERSE & MURPHY, 1990).

Devido à abundância e facilidade de cultivo de *E. crassipes*, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação anticoagulante de polissacarídeos desse vegetal. Para tal *E. crassipes* foi dividida em quatro porções vegetativas, e destas foram obtidos macerados ricos em polissacarídeos hidrossolúveis. Estes foram analisados quanto ao grau de contaminação protéica, quantidade de polissacarídeos, bem como sua atividade anticoagulante.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração dos polissacarídeos

A planta *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Liliopsida - Commeliales) foi coletada em Parnamirim-RN e identificada pela Dr. Maria Iracema Bezerra de Loyola (Depto. de Botânica, Ecologia e Zoologia da UFRN).

Após a coleta, as plantas foram limpas com água corrente, secas, pulverizadas e tratadas quatro vezes, com dois volumes de acetona PA, sob agitação durante 12 horas, para despigmentação e delipidação do material. A acetona foi descartada, e o resíduo

colocado para secar a 45°C sob aeração, aferindo-se novamente o peso seco do material que se convencionou chamar de pó cetônico. Esse pó foi submetido a uma extração dos polissacarídeos como descritos em SILVA et al., 2005. Posteriormente o material foi centrifugado como descrito acima, seco, ressuspendido em água destilada e utilizado em análises posteriores.

Análises químicas

A quantificação dos polissacarídeos extraídos foi realizada como descrito por Dubois et al. (1956) e a galactose foi utilizada como padrão. As proteínas foram quantificadas pelo método de Spector (1978) e a albumina bovina foi usada como padrão.

Atividade anticoagulante

O tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA) e o teste de protrombina (TP) foram realizados como descrito anteriormente (ALBUQUERQUE et al., 2004).

Análise estatística

Os resultados numéricos foram expressos em média aritmética \pm desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando houve diferença, pelo teste de múltiplas comparações de Tukey- Kramer. As análises foram feitas com auxílio do programa GraphPad Prism. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para se promover a extração de constituintes solúveis do vegetal, *Eichhornia crassipes* foi separada em quatro porções vegetativas (rizoma, caule, folha e raiz). Essa escolha se deu devido ao fato de essas porções serem facilmente distinguíveis a olho nu. Cada porção foi então submetida ao processo de extração como descrito em métodos. O material obtido foi seco e pesado, e o rendimento obtido para as porções do pecíolo e rizoma foram semelhantes, aproximadamente, a 22%. Por outro lado, a folha (~37%) foi a porção que apresentou maior rendimento, quase o dobro da raiz (~19%), que foi a porção com o menor rendimento.

O grau de contaminação protéica variou entre 1,35% (rizoma) a 2,34% (pecíolo). O pecíolo foi a porção que mais apresentou proteína em sua constituição. Contudo, de uma forma geral, todas as frações apresentaram baixo grau de contaminação protéica em comparação a extratos obtidos de outros organismos. Hussein et al (1980) extraiu polissacarídeos anticoagulantes da alga marrom *Padina pavonia* e encontrou níveis de contaminação protéica em torno de 67%. Já Silva et al. (2005), trabalhando com a mesma metodologia utilizada neste trabalho, obteve polissacarídeos anticoagulantes da alga *Padina gymnospora* com contaminação protéica em torno de 1,6 – 7,5%. Isso indica que o grau de contaminação protéica é muito dependente do método de extração. A grande maioria dos métodos de extração de polissacarídeos vegetais preconiza a utilização de soluções aquosas levemente ácidas ou básicas. Os dados aqui descritos indicam que o uso de uma enzima proteolítica, ou seja, enzima que degrada outras proteínas, em detrimento desses métodos diminui em muito o risco de alta contaminação protéica.

A quantidade de polissacarídeos extraída de cada porção foi quantificada e os dados estão resumidos na figura 1A. Não houve diferença significativa entre a quantidade de polissacarídeo encontrada nas porções raiz, rizoma e pecíolo; por outro lado, a folha apresentou uma menor quantidade de polissacarídeos. Contudo, quando se fez uma relação entre a quantidade de material obtido com a quantidade de polissacarídeo presente em cada porção, observou-se que a folha foi a porção que apresentou maior rendimento dentre todas as porções (figura 1B). O que indica que polissacarídeos, como outras moléculas sintetizadas por plantas (GOTTLIEB & BORIN, 2000), apresentam uma distribuição quantitativa dependente da porção vegetal analisada.

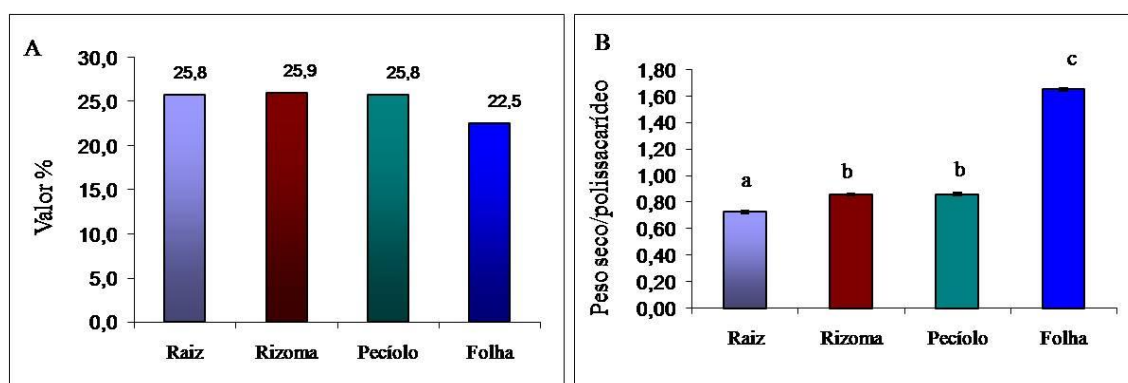


Figura 1. A - Percentual polissacarídico obtido das porções vegetativas. B-Relação entre a massa das porções vegetativas e polissacarídeos presentes nestas. ^{a, b, c} Diferem significativamente com $p < 0,001$.

As soluções polissacarídicas de cada porção foram submetidas a testes de atividade anticoagulante, utilizando-se “Kits” comerciais de TTPa (avalia a via intrínseca da coagulação) e de TP (via extrínseca da coagulação). Cerca de 80mg de cada porção foi utilizada nos testes (Tabela 1). As soluções das porções da raiz e folha foram as que apresentaram melhor atividade anticoagulante para este teste, enquanto que a solução polissacarídica do rizoma foi a que apresentou atividade anticoagulante mais baixa. Já com relação ao teste de TP, nenhuma atividade anticoagulante foi detectada. Esses resultados indicam que o sítio de ação dos polissacarídeos de *E. crassipes* se encontram na via intrínseca da coagulação.

Tabela 1. Atividade anticoagulante das diferentes porções de *E. crassipes*

Porção	TTPa (s)	TP (s)
Raiz	63.9 ± 2 ^a	14.2 ± 0,2
Rizoma	39.1 ± 1 ^b	13.9 ± 0,3
Pecíolo	46.8 ± 2	13.8 ± 0,1
Folha	55.2 ± 2 ^c	13.0 ± 0,2

Os dados representam a média ± desvio padrão de três determinações (n=6).

Tempo de coagulação do controle para PTTa foi 29,3s e para TP foi 13s. ^{a,b,c} Diferem significativamente em relação ao controle com $p < 0,001$, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente.

CONCLUSÃO

Utilizando uma metodologia simples que combina solubilização aquosa, degradação de proteínas contaminantes e precipitação com solvente apolar, foi possível obter polissacarídeos de diferentes porções vegetativas da planta *E. crassipes*. A presença de polissacarídeos foi evidenciada por dosagens químicas, sendo que a folha foi a porção que apresentou a maior quantidade de polissacarídeos solúveis. O baixo grau de contaminação protéica indica que a metodologia é apropriada para a obtenção de polissacarídeos de vegetais. Teste de atividade anticoagulante mostrou a presença de polissacarídeos com essa atividade. Este é o segundo trabalho na literatura que demonstra atividade anticoagulante de polissacarídeos de vegetais superiores. Espera-se, em trabalho futuros, promover a caracterização desses polissacarídeos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao MCT/CNPq (Processos n° 620134/2006-2; 483858/2006-4) e a CAPES pelo financiamento de parte das pesquisas, cujos dados foram apresentados neste trabalho. J. M. C. Silva agradece a CAPES por sua bolsa de mestrado. H. A. O. Rocha é bolsista de produtividade do CNPq (Processo n° 308860/2006-3).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque, I.R.L. et al. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.37, p.167-71, 2004.

Dubois, M. et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*. v.28, p. 350-56, 1956.

Gopal, B. Water hyacinth. **Elsevier**, New York, NY. 1987.

Gottlieb, O. R.; Borin, M. R. M. B. Quimiosistemática como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões, C.M.O. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis:EdUniversidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2000, p.75-86.

Henry-Silva, G.G.; Camargo, A.F.M. Composição química de quatro espécies de macrófitas aquáticas e possibilidades de uso de suas biomassas. *Naturalia*. v.26, p.111-125, 2000.

Hirsh, J.; Lee, A.Y. How we diagnose and treat deep vein thrombosis. *Blood*. v. 99. p. 3102-3110. 2002.

Husseim, M. et al. Some structural features of a new sulphated heteropolysaccharides from *Padina pavonia*. *Phytochemistry*. v19, p. 2133-35, 1980.

Mansur, A.P. et al. Prescription and adherence to statins of patients with coronary artery disease and hypercholesterolemia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 76 (2). p. 111-118.2001.

Petr, T. Interactions between fish and aquatic macrophytes in inland waters: A review. *FAO Fisheries Technical Paper*. v. 396. p. 185. 2000.

Pieterse, A. H.; Murphy, K. Aquatic weeds and management of nuisance aquatic vegetation. *Oxford University Press*, New York, p. 593. 1990.

Rocha, H. A. O.; Leite, E. L.; Medeiros, V. P.; Lopes, C. C.; Nascimento, F. D.; Tersariol, I. L. S.; Sampaio, L. O.; Nader, H. B. Natural sulfated polysaccharides as antithrombotic compounds. Structural characteristics and effects on the coagulation cascade. In: Verli, H. *Insight into carbohydrate structure and biological fuction*. Kerala: Transworld Research Network, 2006. p.51-67.

Silva, T.M.A.; Alves, L.G.; Quiroz, K.C.S.; Santos, M.G.L.; Marques, C.T.; Chavante, S.F.; Rocha, H.A.O.; Leite, E.L. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucana from the brown seaweed *Padina gymnospora*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.18, p.523-33, 2005.

Spector, J. Refinement of the coomassie blue method of protein quantification. A simple and linear spectrophotometric assay of 0.5 to 50 μ g of protein. *Analytical Biochemistry*, v86, p. 142-143, 1978.

Yoon , S.J.; Pereira, M.S.; Pavão, M.S.G.; Hwang, J.K.; Pyun, Y.R.; Mourao, P.A. S. The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. *Thrombosis Research*. v. 106. p. 51-58. 2002.

Dayanne Lopes Gomes

Endereço eletrônico: dayanne_gomes@hotmail.com

Base de pesquisa: *Laboratório de biotecnologia de polímeros naturais*

Endereço postal: Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário, 59078-970, Natal/RN – Brasil.