

SULFATAÇÃO E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DO EXOPOLISSACARÍDEO FÚNGICO BOTRIOSFERANA. Janaina Farias de Ornelas, Maria de Lourdes Corradi da Silva, Nilson Kobori Monteiro, Jamile Brandi, Ana Flora Dalberto Vasconcelos, Aneli Melo Barbosa.- Bioquímica- Licenciatura em Química- Departamento de Física Química e Biologia- Faculdade de Ciências e Tecnologia- Campus de Presidente Prudente.

As β -glucanas são uma importante classe de polissacarídeos produzidos por muitos microrganismos (bactérias, algas e fungos), e que possuem diversas atividades biológicas, como antitumorais, imunoestimulatória ou antiolesterolêmica. Essas atividades podem estar relacionadas como a composição de monossacarídeos, grau de ramificação, grau de polimerização, estrutura das cadeias constituintes e conformação dessas moléculas em solução (HWANG *et al.*, 2003).

Esses polímeros com elevada massa molecular formam soluções muito viscosas (SURENJAV *et al.*, 2006), e a administração sistêmica dos EPS pode apresentar efeitos colaterais. A inserção de grupos químicos como sulfatos ou carboxilas, gera compostos mais solúveis e consequentemente facilita as aplicações biológicas dessas substâncias (WILLIAMS, 1997; ZHANG *et al.*, 2000).

O fungo ligninolítico *Botryosphaeria rhodina* produz uma quantidade expressiva de exopolissacarídeo (EPS) quando crescido em glicose como única fonte de carbono, que é responsável pelo aumento da viscosidade no meio de cultura. Este EPS foi denominado botriosferana e teve sua estrutura caracterizada como uma glucana do tipo β -D (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6) (BARBOSA *et al.*, 2003).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo a derivatização química do botriosferana, por sulfatação, visando aumentar a solubilidade de suas soluções e também prepará-lo para testes de atividade anticoagulante.

Antes de ser sulfatado o material foi purificado por cromatografia de filtração em gel (Sephacrose CL-4), sendo este mesmo procedimento utilizado após a sulfatação, para verificar possíveis degradações da molécula. Para a reação de derivatização, o polissacarídeo foi solubilizado em formamida (FA), permanecendo sob agitação por 24 horas. A piridina foi utilizada como catalisador da reação, facilitando a entrada dos grupamentos sulfatos derivados do agente sulfatante, ácido clorosulfônico (gotejado por 1 hora em banho de gelo). O experimento foi interrompido pela adição de água gelada e a mistura neutralizada com NaHCO_3 (O'NEILL, 1955). O material foi dialisado e liofilizado gerando uma fração solúvel (S-Bot) e então este procedimento repetido 2X, fornecendo a fração R-Bot1. Análises de UV-VIS e FT-IR (Infra vermelho acoplado a transformada de Fourier) foram realizadas para acompanhar as reações. O grau de sulfatação (DS) foi determinado de acordo com Whistler e colaboradores (1964).

Para a análise de atividade anticoagulante foram utilizados os testes clássicos de coagulação: APTT (tempo de tromboplastina parcial ativada), TT (tempo de trombina) e PT (tempo de protrombina) utilizando heparina como padrão (140 UI/mg).

A filtração em gel realizada antes e após a sulfatação demonstrou que o botriosferana eluiu como um único pico simétrico, indicando que o EPS estava homogêneo e íntegro (Figura 1).

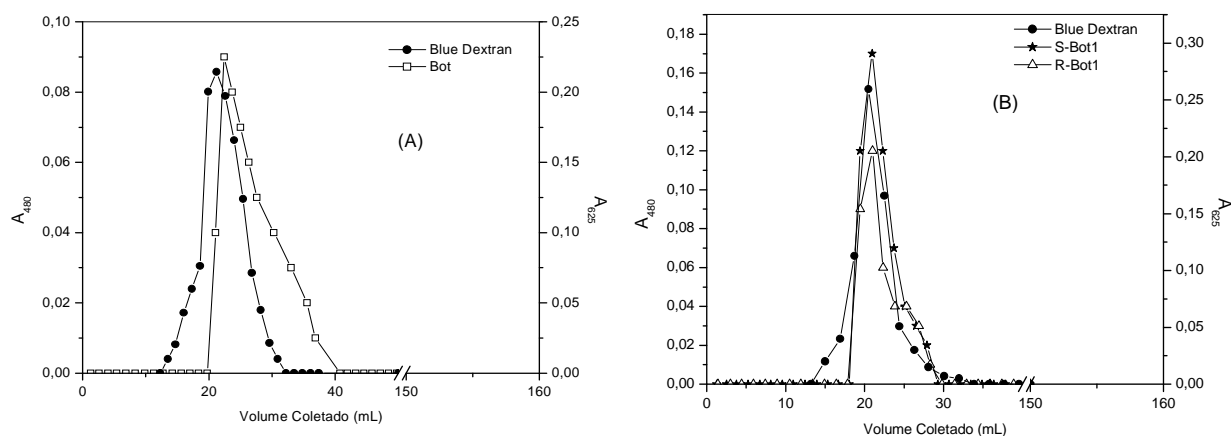


Figura 1: Cromatografia de filtração em gel de (A) botriosferana nativa e (B) resultada produzida pelo *Botryosphaeria rhodina* crescido em glicose como única fonte de carbono. Coluna: Sepharose CL-4B (1,5x28,8 cm), fração coletada 1,5 mL, taxa de fluxo 0,5 mL/min. A₄₈₀=Bot, R-Bot1 and S-Bot; A₆₂₅=Blue Dextran

Os experimentos de derivatização geraram a fração solúvel R-Bot1 com grau de sulfatação 1,64, valor consistente com dados da literatura, pois a atividade biológica é favorecida com valores acima de 0,8. (HAN *et al.*, 2005).

A espectroscopia UV-VIS apresentou uma banda em 259nm, atribuída à ligação insaturada formada no processo de sulfatação (Figura 2).

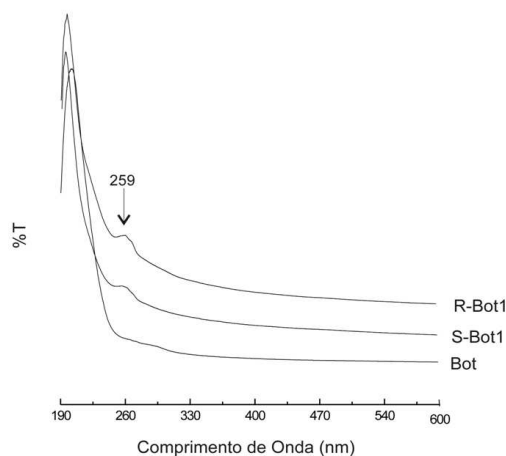


Figura 2: Espectro de absorção do botriosferana antes e após procedimento de sulfatação.

O FT-IR demonstrou que os grupos sulfatos foram inseridos dentro do botriosferana, devido a presença de novas bandas em 807cm^{-1} e 1252cm^{-1} (Figura 3). Esta técnica apresenta um largo emprego em análises quantitativas e qualitativas de carboidratos. Pela análise de infravermelho é possível verificar o desaparecimento dos grupos funcionais hidroxila com aparecimento de novos grupos sulfato introduzidos pela reação de sulfatação. As duas bandas mostradas no gráfico estão relacionadas respectivamente à vibração C-O-S simétrica associada a um grupo C-O-SO₃ e uma vibração S=O assimétrica. Pode-se também observar nesta figura o aumento de grupos sulfatos em cada reação, pois as regiões de absorção tornam-se cada vez mais características e marcantes.

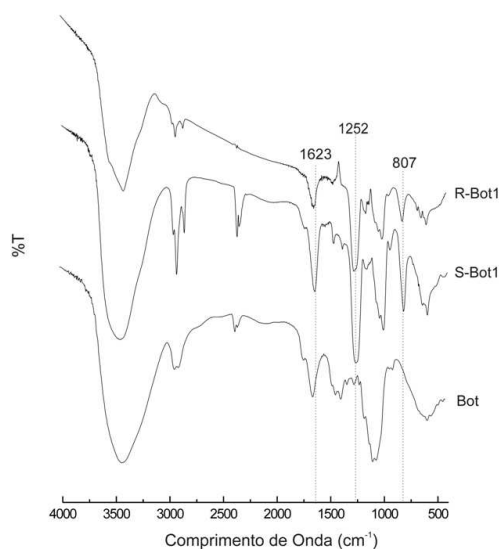


Figura 3: Espectro de FT-IR do botriosferana (Bot), do sulfatado (S-Bot) e resultatado (R-Bot1)

A Tabela 1 mostra os resultados da atividade anticoagulante de Bot e R-Bot1 determinada pelo APTT, TT e PT e comparada com os resultados do padrão heparina. Pode-se observar que R-Bot1 permitiu o prolongamento dos testes APTT e TT. Os resultados demonstraram importante atividade anticoagulante *in vitro* da fração sulfatada, devido ao aumento evidente da dependência de concentração para APTT e TT, o que pode ser atribuído ao grau de sulfatação apresentado pela molécula. De acordo com MARTINICHEN-HERRERO e colaboradores (2005) o prolongamento do tempo de formação do coágulo no APTT pode sugerir inibição da via intrínseca da coagulação enquanto que o prolongamento do TT indica inibição da trombina. A relativa perda de efeito de R-Bot1 no PT é consistente com a observação que este teste não é sensível para a heparina e para outros polissacarídeos sulfatados. O botriosferana nativo (Bot) não inibiu os ensaios, pois a presença de grupos sulfatos é essencial para a atividade anticoagulante.

Tabela 1: Atividade anticoagulante de plasma humano na presença do botriosferana (Bot), do botriosferana resultado (R-Bot1) e heparina determinado pelo APTT (tempo de tromboplastina parcial ativada), PT (tempo de protrombina) e TT (tempo de trombina).

Amostra	APTT		TT		PT	
	Plasma ($\mu\text{g/mL}$)	Tempo (s)	Plasma ($\mu\text{g/mL}$)	Tempo (s)	Plasma ($\mu\text{g/mL}$)	Tempo (s)
Bot	0	30.4 \pm 0.2	0	14.9 \pm 0.1	0	15.5 \pm 0.25
	10	27.7 \pm 0.1	10	14.2 \pm 0.3	10	15.5 \pm 0.4
	15	29.7 \pm 0.9	15	15.9 \pm 1.2	15	14.1 \pm 0.4
	20	32 \pm 0.8	20	15.7 \pm 0.4	20	15.5 \pm 0.7
R-Bot1	0	30.4 \pm 0.2	0	14.9 \pm 0.1	0	15.5 \pm 0.25
	10	59.6 \pm 0.8	10	24.4 \pm 0.84	10	15.5 \pm 0.5
	15	96.7 \pm 3.4	15	29.8 \pm 0.25	15	16.3 \pm 0.4
	20	117.5 \pm 2.8	20	41.2 \pm 1.3	20	16.1 \pm 0.7
	30	205.1 \pm 2.9	30	101.7 \pm 0.9	30	16.6 \pm 0.6
	40	304.5 \pm 2.3	40	157.7 \pm 0.01	40	16.1 \pm 0.2
Heparina	0	30.4 \pm 0.2	0	14.9 \pm 0.1	0	15.5 \pm 0.25
	1	44.04 \pm 1	1	27.9 \pm 1.4	1	15.8 \pm 0.42
	2	67.7 \pm 2.9	2	50 \pm 0.75	2	16.1 \pm 0.9
	3	100.1 \pm 3.6	3	88.2 \pm 8.3	3	16.6 \pm 0.11

Portanto, nossos estudos mostraram que a solução de R-Bot1 tornou-se menos viscosa pelo procedimento da sulfatação e que o polissacarídeo sulfatado foi eficaz como agente anticoagulante *in vitro*.

Referências Bibliográficas

- BARBOSA, A. M.; STELUTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; CORRADI DA SILVA, M. L.; Structural Identification of Botryosphaeran: a 1,3; 1,6 beta D-glucan Produced by the Fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**. v.338, p.1691 – 1698, 2003.
- HWANG, H. J.; KIM, S. W.; CHOI, J. W.; YUN, J. W.; Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. **Enzyme and Microbiol Technology**. v.53, p.309 – 319, 2003.
- O'NEILL, A. N.; Sulphated derivatives of Laminarin. **Canadian Journal Chemistry**. v.33, p.1097–1101, 1955.
- WILLIAMS, D. L.; Overview of (1→3)- β -D-glucan immunobiology. **Mediators of Inflammation**. v.6, p.247 – 250, 1997.

ZHANG, L.; ZHANG, M.; ZHOU, Q.; CHEN, J.; ZENG, F.; Solution Properties of Antitumor Sulfated Derivative of α -(1 \rightarrow 3)-D-Glucan from *Ganoderma lucidum*. **Biosciences and Biotechnology Biochemical**. v.64, p.2172-2178, 2000.

WHISTLER, R.L.; SPENCER, W.W.; Sulfation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York. v.4, p.235-275, 1964.

HAN, F.; YAO, W.; YANG, X.; LIU, X.; GAO, X. Experimental study on anticoagulant and antiplatelet aggregation activity of a chemically sulfated marine polysaccharide YCP **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 36, p. 201-207, 2005.

SURENJAV, U.; ZHANG, L.; XU, X.; ZHANG, X.; ZENG, F.. Effects of molecular structure on antitumor activities of (1 \rightarrow 3)- β -d-glucans from different *Lentinus Edodes* **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 97-104, 2006.

MARTINICHEN-HERRERO, J.C.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirense* Hale. **Carbohydrate Polymers**. v.60, p.7-13, 2005.