

Fracionamento do Látex de Mangabeira e Análise de Proteínas Totais

Gleiciane Soares Pereira^{1*} (IC), Patrícia Lima D'Abadia² (PG), Luciane Madureira de Almeida^{1,2} (PQ).

Email: gleicianesoaresbio@gmail.com

¹ Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual de Goiás (Campus de Ciências Exatas e Tecnológicas).

² Doutorado em Recursos Naturais do Cerrado, Universidade Estadual de Goiás (Campus de Ciências Exatas e Tecnológicas).

O látex de mangabeira possui valor terapêutico e é empregado na medicina popular para o tratamento de inúmeras enfermidades. Além do uso popular, pesquisas têm mostrado que o látex de mangabeira possui alto potencial angiogênico, e ausência citogenotoxicidade em diferentes modelos biológicos. O objetivo desse trabalho foi fracionar o látex de mangabeira, e identificar o perfil protéico e a presença de metabólitos secundários da fração do látex que apresenta a maior atividade angiogênica. Após o fracionamento foram obtidos duas frações, a fração borracha e a fração soro com o seu precipitado, a qual foi chamada de F1. O perfil protéico foi obtido após a submissão da fração F1 à eletroforese em gel de poliacrilamida, onde foram visualizadas 8 bandas com peso molecular variando de aproximadamente 16.5 a 140 KDa. Os resultados da prospecção fitoquímica da fração F1 identificou no látex de mangabeira a presença de taninos e flavonóides. Esses compostos possuem potencial farmacológico, uma vez que apresentam atividades antioxidante, antimicrobiana e angiogênica.

Palavras-chave: Cerrado; Mangaba; Plantas medicinais; Perfil Protéico; Prospecção Fitoquímica.

Introdução

Milhares de espécies vegetais possuem valor terapêutico e são frequentemente empregadas na medicina popular (GUARIN-NETO, 1997). Um produto vegetal comumente empregado para o tratamento de inúmeras enfermidades é o látex de algumas plantas. Estimativas indicam que existem de 12 a 35 mil espécies lactíferas com seu potencial farmacológico praticamente desconhecido (KONNO et al., 2004). Dentre elas está o látex de mangabeira (*Hancornia speciosa*), planta nativa do Cerrado e pouco explorada comercialmente. Uma das interessantes propriedades do látex da mangabeira é sua baixa carga de proteínas (MALMONGE et al., 2009) e seu alto potencial angiogênico (ALMEIDA et al., 2014). Além da angiogênese, trabalhos mostram que o látex de mangabeira possui alta biocompatibilidade e ausência de citogenotoxicidade em células vegetais (RIBEIRO et al., 2015) e animais (ALMEIDA et al., 2015; FLORIANO et al., 2016). Diante da potencialidade do látex de mangabeira como novo biomaterial para aplicações terapêuticas é interessante identificar os compostos presentes na fração

com atividade angiogênica. Pensando nisso, foi realizado nesse trabalho uma eletroforese em gel de poliacrilamida para a identificação do perfil protéico da fração F1 e a prospecção fitoquímica para identificação dos metabólitos secundários.

Material e Métodos

Foram coletadas amostras do látex de *H. speciosa* em árvores da coleção de mangabeiras da Universidade Estadual de Goiás, no município de Ipameri, Goiás. O látex foi coletado em tubos falcon por gotejamento durante o sangramento das árvores. Ao final da coleta, foram adicionados 100 μ L de água destilada para cada 20 mL de látex, para evitar a coagulação do látex. A seguir, o material foi acondicionado à temperatura de 8°C até o fracionamento. A separação das fases realizou-se em duas centrifugações de alta velocidade em centrífuga refrigerada da marca Thermo Scientific modelo Heraeus Megafuge 16R. Cada centrifugação teve a duração de 1 h, a 22.000 g e 4 °C, segundo metodologia adaptada de Honorato (2005). Após esse processo o látex apresentou duas frações: a primeira de menor densidade, a qual é predominantemente composta por partículas de borracha (isopreno); e a fração aquosa composta pelo soro e a fração de fundo ou precipitado (chamada de F1). As fases foram retiradas dos eppendorfs e isoladas com o auxílio de micropipetas e seringas com agulha.

A caracterização protéica foi realizada por meio da precipitação das proteínas com o ácido tricloroacético (15%). O precipitado foi dissolvido em tampão de amostra (glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8 0,0625 M), fervidos por 15 minutos e aplicados em gel. O gel de 12% de SDS-poliacrilamida com 1mm de espessura foi confeccionado e submetido a uma corrente de 40mA, com voltagem constante em um sistema de mini-gel. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue.

Também foi realizada a prospecção fitoquímica para identificação das principais classes de metabólitos secundários presentes na fração F1 do látex de *H. speciosa*. A metodologia utilizada foi a de Matos (1989) e Costa (2001). Para a realização de todas as análises fitoquímicas, foi utilizada a fração F1 dissolvida em etanol P.A (1:1).

A primeira triagem realizada buscou por compostos fenólicos na amostra. Para isso, usou-se quatro reações de identificação: reação com gelatina (quatro

gotas de gelatina a 2,5% em 2 mL de soro), reação com alcalóides (quatro gotas de sulfato de quinina a 1% em 2 mL de soro), reação com sais metálicos (duas gotas de cloreto férrico a 10% em 2 mL de soro) e reação com hidróxidos alcalinos (cinco gotas de hidróxido de sódio a 20% em 2 mL de soro). Em todas as reações observou-se se houve a ocorrência de precipitado e/ou mudança de coloração.

A pesquisa por flavonóides foi feita, primeiramente, por meio da reação com hidróxidos alcalinos, na qual foram colocados 400 μ L de hidróxido de sódio a 20% em 1 mL de soro. Em seguida, realizou-se a reação com ácido sulfúrico, onde foi evaporado até semi-secura 1 mL de soro, em cápsula de porcelana. Posteriormente, adicionou-se 300 μ L de ácido sulfúrico a 10% e observou-se sob luz ultravioleta (UV) o surgimento de fluorescência. A seguir, foi feita a reação oxalo-bórica, na qual foram evaporados em cápsula de porcelana 1 mL de soro. Foi adicionado ao resíduo semi-seco 1 mL de ácido bórico a 3% e 400 μ L de ácido oxálico. Após secar a amostra, foi misturado ao resíduo seco 7 mL de éter etílico, o qual foi observado sob luz UV. Depois, foi realizada a reação com cloreto de alumínio, onde se colocou em um béquer 1 mL de soro, o qual foi aquecido e concentrado até metade do volume e colocado, posteriormente, em papel de filtro juntamente com 2 mL de cloreto de alumínio a 5%. A presença de fluorescência foi observada em luz UV. Realizou-se também a reação de cianidina ou reação de Shinoda misturando 1 mL de soro a 400 μ L de ácido clorídrico (10%) e a 1cm de fita de magnésio. Por último, foi feita a reação com cloreto férrico adicionando-se duas gotas de cloreto férrico a 4,5% em 1 mL de soro. As cores resultantes nas duas últimas reações descritas foram anotadas.

Resultados e Discussão

Foram obtidas duas frações de látex de mangabeira após o fracionamento por centrifugação com alta rotação. A fração borracha, rica em poliisopropeno e a fração aquosa com seu precipitado, denominada nesse trabalho de F1. A Figura 1 mostra a separação das frações.



Figura 1: Fracionamento do látex de mangabeira através de centrifugação com alta rotação. a) fração borracha e b) fração F1 (soro mais precipitado)

Após o fracionamento, a fração F1 foi submetida à eletroforese em gel para obtenção do perfil protéico. O resultado obtido está apresentado na Figura 2. Pode se observar a presença de 8 bandas com peso molecular variando de aproximadamente 16.5 KDa a 140 KDa. A presença de poucas bandas no gel está de acordo com os resultados obtidos por Malmonge e colaboradores 2009, no qual identificou baixo conteúdo de proteínas no látex de mangabeira através da análise do conteúdo de nitrogênio na amostra. O baixo conteúdo de proteínas pode ser uma vantagem terapêutica, uma vez que os estudos com seringueira mostram que as proteínas presentes no látex é que são responsáveis em determinar alergias em humanos (YAGAMI et al., 2004).

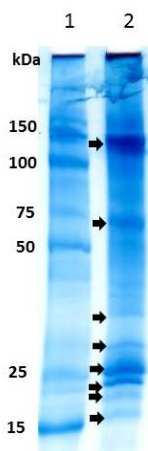


Figura 2: Eletroforese em gel de poliácridamida da fração F1 do látex de mangabeira. 1. Marcador de peso molécula (Lw da GE Healthcare), e 2. Fração F1 do látex de mangabeira.

Em relação à presença de metabólitos secundários a prospecção fitoquímica identificou diferentes classes de compostos os quais estão apresentados na Tabela 1. De uma forma geral foram identificados a presença de taminos e flavonóides, mas não foram detectados alcaloides, antraquinonase e cumarinas. Os flavonóides destacam-se pela sua importância farmacológica por serem compostos que possuem atividade antioxidante, antiproliferativa, anti-inflamatória, antiulcerogênica, antimicrobiana (GRANATO et al. 2013), antialérgica, hepatoprotetora, antitrombica, antiviral e anticarcinogênica (MIDDLETON JUNIOR et al. 2000). Já os taninos, são compostos fenólicos que apresentam atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres, ação antinfeciosa, antibacteriana, antifúngica e antiprotzoária (BESSA et al., 2013; OLIVEIRA; ALMEIDA, 2016). Esses resultados mostram que a fração F1 do soro de látex de mangabeira pode ser um biomaterial com potencial para aplicações médicas.

Tabela 1: Prospecção fitoquímica da fração F1 do látex de *H. speciosa*.

Metabólitos secundários	Reação de Caracterização	Resultados	Coloração/ Precipitado
Alcalóides	Reação de Bouchardat	Negativo	-
	Reação de Dragendorff	Negativo	-
	Reação de Mayer	Negativo	-
Antraquinonas	Reação de Borntrager	Negativo	-
Cumarinas	Reação com NaOH 1N	Negativo	-
Flavonóides	Reação de Shinoda	Positivo	Laranja
	Reação Oxalo-Bórica	Positivo	Fluorescente
	Reação com H ₂ SO ₄ concentrado	Positivo	Fluorescente
	Reação com hidróxidos alcalinos	Positivo	Amarelo escuro
	Reação com Cloreto de Alumínio	Positivo	Fluorescente
	Reação com Cloreto Férrico	Positivo	Verde castanha
Taninos	Reação com gelatina	Positivo	Precipitou
	Reação com Alcalóides	Positivo	Precipitou
	Reação com Sais Metálicos	Positivo	Verde escuro
	Reação com Hidróxidos Alcalinos	Positivo	Precipitou

Considerações Finais

Nesse trabalho foi realizado o fracionamento do látex de mangabeira e os dados obtidos demonstraram que a fração F1 do látex de *H. speciosa* apresenta

cerca de 8 proteínas com peso molecular variando de 16.5 até 140 KDa. Além das proteínas, também foram identificados na fração F1 do látex flavonóides e taminos, os quais são descritos na literatura como compostos que possuem atividade antioxidante, antimicrobiana e de forte potencial angiogênico.

Agradecimentos

Programa de Bolsas de iniciação em desenvolvimento tecnológico PBIT/UEG

Referências

ALMEIDA, L. M.; FLORIANO, J. F.; RIBEIRO, T.P.; MAGNO, L.N.; DA MOTA, L.S.L.S.; PEIXOTO, N.; MRUÉ, F.; MELO-REIS, P.R.; LINO JÚNIOR. R.S.; GRAEFF, C.F.O.; GONÇALVES, P.J. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine** (Dordrecht. Online), v. 1, 2014.

ALMEIDA, L. M.; PRADO, A. D.L.; D'ABADIA P.L.; MACHADO, K. B.; MELO-REIS, P. R.; NABOUT, J. C.; GONÇALVES, P.J.. The state-of-art in angiogenic properties of latex from different plant species. *Current Angiogenesis*, 2015, 4, 10-23

BESSA, N.G.F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.4, supl.I, p.692-707, 2013.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v.3.

FLORIANO, J.; NETO, F.; MOTA, L.; FURTADO, E.; FERREIRA, J. R. R.; BARRAVIERA, B.; GONÇALVES, P.; ALMEIDA, L.; Graeff C. Comparative study of bone tissue accelerated regeneration by latex membranes from *Hevea brasiliensis* and *Hancornia speciosa*". *Biomed. Phys. Eng. Express* 2 (2016) 045007

GUARIM NETO, G. Plantas utilizadas na medicina popular do estado de Mato Grosso. Ministério da Ciência e Tecnologia, p.58, 1997.

GRANATO, E.M. et al. Phytochemical screening of plant species *Trixis antimenorrhoea* (Schrank) Kuntze. **Rev. Bras. Farm.**, v.94, n.2, p.130-135, 2013.

HONORATO, S.B. Efeito antioxidante de componentes do látex da seringueira e mangabeira sobre a degradação termo-oxidativa do poli(1,4-cis-isopreno) sintético. 2005. 76f. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Curso de Pós-

graduação em Química Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - Ceará. 2005.

KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y., HATTORI, M.; KOHNOK, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal**, v. 37, p. 370-378, 2004.

MALMONGE, J.A.; CAMILO, E.C.; MORENO, R. M. B.; MATTOSO, L. H. C.; MACMAHAN, C. M. Comparative study on technological properties of látex and natural rubber from *Harconia speciosa gomes* and *Hevea brasiliensis*. **Journal of Applied Polymer Science**, USA, v. 111, p. 2986–2991, 2009.

MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. **Farmacognosia**. Fortaleza: UFC, 1989.

MIDDLETON JUNIOR, E. et al. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol. Rev.**, v.52, n.4, p.673-751, 2000.

OLIVEIRA, N.T.; ALMEIDA, S.S.M.S. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida* Aublet (Apocynaceae). **Bio. Amaz.**, v.6, n.1, p.20-25, jun. 2016.

RIBEIRO, T. P.; SOUSA, T. R.; ARRUDA A. S.; PEIXOTO, N.; GONÇALVES, P. J.; ALMEIDA, L. M. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Hancornia speciosa* latex in *Allium cepa* root model. **Brazilian Journal of Biology** (Online), <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.20114>

YAGAMI, T.; HAISHIMA, Y.; TSUCHIYA, T.; TOMITAKA-YAGAMI, A.; KANO, H.; MATSUMAGA, K.. Proteomic analysis of putative látex allergens. *Int. Arch of Allergy and Immunology*. v.135, p. 3-11, 2004.