



Caracterização química e avaliação dos potenciais antioxidante e antibacteriano da fração aquosa do látex de mangabeira

Patrícia Lima D'Abadia^{1(PQ)*}, Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão^{1(PQ)}, Leandra de Almeida Ribeiro de Oliveira^{1(PQ)}, Edemilson Cardoso da Conceição^{2(PQ)}, Leonardo Luiz Borges^{1(PQ)}, Luciane Madureira de Almeida^{1(PQ)}.

¹ Universidade Estadual de Goiás – CCET, Anápolis, GO, Brasil;

² Universidade Federal de Goiás – Faculdade de Farmácia, Goiânia, Goiás

*email: patricialima.bio@gmail.com

Resumo: Na medicina moderna, o látex vem sendo empregado como constituinte de biomateriais para o tratamento de inúmeras enfermidades. A mangabeira (*Hancornia speciosa*), uma planta nativa do Cerrado, pode ser uma alternativa para extração de látex para utilização biomédica, devido sua atividade angiogênica, além de sua biocompatibilidade e não toxicidade com sistemas vivos. Os objetivos desse trabalho foram: identificar compostos presentes na fração aquosa do látex de *H. speciosa* e avaliar o potencial antioxidante e antibacteriano dessa fração. Na caracterização química da fração aquosa, realizada por meio da técnica de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência, foi identificada a presença do ácido clorogênico nessa fração. O ácido clorogênico é conhecido por possuir atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, propriedades estas, que podem acelerar o processo de regeneração de tecidos. O potencial antioxidante foi avaliado através do método do sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e os resultados obtidos mostram que o látex de mangabeira possui relevante atividade antioxidante. Sabe-se que, compostos antioxidantes podem auxiliar as etapas da cicatrização tecidual, por atuarem na captura de radicais livres, os quais retardam o processo regenerativo. O potencial antibacteriano foi avaliado pelo método de difusão em ágar e os resultados indicam ausência de atividade antibacteriana.

Palavras-chave: Ácido clorogênico. *Hancornia speciosa*. Látex. Radicais livres.

Introdução

A utilização de recursos naturais para fins terapêuticos vem ocorrendo desde o surgimento e consolidação das civilizações humanas, de tal maneira que esses produtos, sejam eles de origem mineral, vegetal ou animal, tornaram-se fundamentais para manutenção e melhoria da qualidade de vida humana (Rodrigues & Amaral, 2012). A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de dois bilhões de pessoas no mundo utilizam-se da medicina popular baseada na extração de princípios ativos das plantas, para o tratamento de doenças (Smith-Hall et al., 2012).

Um produto vegetal que tem despertado interesse e já é comumente empregado para o tratamento de inúmeras enfermidades é o látex de algumas plantas. Dentre as plantas produtoras de látex, a mais conhecida e explorada



comercialmente é a seringueira (*Hevea brasilienses*). Em relação às potencialidades desse látex, destacam-se suas propriedades indutoras de regeneração tecidual, cicatrização de feridas em tecidos cutâneos (Frade et al., 2012), restituição de membrana timpânica (Araújo et al., 2012), regeneração de ossos (Floriano et al., 2016), restituição da retina de coelho (Sampaio et al., 2010), dentre outras. A partir da descoberta do potencial angiogênico do látex, em 2009 foi criada uma biomembrana na forma de bandagem, chamado Biocure[®]. Atualmente, o Biocure teve sua fabricação descontinuada e foi substituído por outra formulação em gel-creme, chamada de Regederm[®], a qual é utilizada no tratamento e cicatrização de feridas cutâneas (Pelenova, 2017).

Apesar dos expressivos resultados obtidos no uso medicinal e comercial do látex de *H. brasilienses*, existem muitos relatos sobre alergias a produtos a base desse látex (Raulf, 2014). A grande incidência de alergia a esse látex, ocasionada pelo contato direto com proteínas alergênicas nele presentes (WU et al., 2016), representa um dos principais motivos para se buscar outras espécies lactíferas produtoras de látex com menor potencial alergênico. A mangabeira (*Hancornia speciosa*), planta nativa do Cerrado e pouco explorada comercialmente, pode ser uma alternativa para extração de látex para utilização biomédica. Dentre as vantagens do uso da mangabeira, destaca-se a biocompatibilidade e não toxicidade do seu látex, além de seu comprovado potencial angiogênico e possibilidade de esta planta produzir um látex hipoalergênico (Malmonge et al., 2009; Almeida et al., 2014). A possibilidade de ser hiporalergênico provém do fato de que o conteúdo proteico do látex de mangabeira é bem inferior ao do látex de seringueira (Malmonge et al., 2009).

A mangabeira é uma planta bastante utilizada na medicina popular, sendo indicado o uso de sua casca para tratar dermatoses e doenças que atingem o fígado, tratamentos antiinflamatórios e para combate de diabetes e perda de peso (Grandi et al., 1989). Já suas raízes são indicadas no tratamento de luxações, reumatismo e são receitadas para o uso como medicamento antigástrico e anti-hipertensivo (Conceição et al., 2011). O látex e folhas, por sua vez, são usados como adstringente para tratar sintomas de cólicas menstruais, dermatoses,



tuberculose, úlceras, herpes, verrugas e também doenças no fígado (Soares et al., 2006).

No que diz respeito a dados científicos a cerca das propriedades terapêuticas de partes da mangabeira, observou-se que as folhas dessa planta possuem substâncias ativas com potencial atividade sobre o controle da pressão arterial (Silva et al., 2016), tratamento de feridas e doenças inflamatórias (Geller et al., 2015) e tratamento de diabetes mellitus (Pereira et al., 2015). De acordo com Santos e colaboradores (2018), o extrato etanólico da folha de *H. speciosa* possui atividade antioxidante, antimutagênica, anti-inflamatória, antiobesidade, anti-hiperglicemiante, além de atuar contra doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e Alzheimer. Extratos da casca de *H. speciosa* possuem substâncias eficazes no combate e cura de úlceras gástricas causadas por *Helicobacter pylori* (Moraes et al., 2008). Já o seu látex apresentou atividade anti-inflamatória em ratos (Marinho et al., 2011), atividade angiogênica em ovos de galinha (Almeida et al., 2014), e atividade osteogênica na calvária de ratos (Neves et al., 2016) e coelhos (Floriano et al., 2016). Além disso, Costa *et al.* (2008) identificou o potencial antimicrobiano do extrato etanólico da mangabeira.

Diante das potencialidades terapêuticas do látex da mangabeira e de seu comprovado potencial angiogênico, nosso grupo de pesquisa avaliou recentemente, a atividade angiogênica das diferentes frações desse látex e identificou que a fração responsável pela angiogênese foi a fração aquosa (D'Abadia, 2016).. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os metabólitos secundários presentes na fração aquosa do látex de *H. speciosa* e avaliar o potencial antioxidante e antibacteriano dessa fração.

Material e Métodos

A. Obtenção da fração aquosa do látex de *H. speciosa*

As amostras de látex de *H. speciosa* utilizadas foram coletadas em árvores da coleção de mangabeiras da Universidade Estadual de Goiás, no município de Ipameri/Goiás. A fração aquosa foi separada do látex por meio de duas centrifugações de alta velocidade em centrífuga refrigerada da marca Thermo



scientific model Heraeus Megafuge 16R. Cada centrifugação teve a duração de 1 h, a 22.000 g e - 4 °C.

B. Caracterização química da fração aquosa do látex de *H. speciosa* por meio de Cromatografia a líquido de Alta Eficiência (CLAE)

A caracterização química da fração aquosa, quanto à presença de metabólitos secundários, foi realizada por meio de investigação qualitativa, traçando-se um *fingerprint* cromatográfico da amostra de látex.

As análises foram realizadas em um Sistema Cromatográfico da marca Waters® modelo HPLC Alliance® com módulo de separação e2695 (Milford, MA, USA), detector de arranjo de diodo (DAD 2998) e sistema de processamento de dados Enpower 3. As separações cromatográficas foram conduzidas em coluna de fase reversa Zorbax eclipse XDB 5 µ C18, 250X4.6 mm.

A fase móvel utilizada nessa análise consistiu em acetonitrila acidificada com 0,2% de ácido fosfórico (v/v), metanol e 0,05% de ácido fosfórico (v/v) em água e em proporções diferentes. Tal fase foi primeiramente, filtrada em uma membrana de 0,45 µm (Millipore, MA, USA) e depois degaseificada durante 20 min em ultrasonicador. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min e a temperatura da coluna foi ajustada para 30°C. As amostras de látex foram solubilizadas em metanol e filtradas através de membrana Millex® de 0,22 µm (Millipore, MA, USA). Foi injetado um volume de 10 µL de amostra no cromatógrafo.

Os compostos da fração foram identificados por comparação de seus tempos de retenção e espectros de absorção (190-400 nm) com os dos seguintes padrões puros: quercetina, rutina, kaempferol, ácido gálico, ácido elágico, galato de epigallocatequina, hidrato de catequina e ácido clorogênico; os quais foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Essas substâncias foram encontradas na literatura como constituintes da família Apocynaceae, a qual pertence a *H. speciosa* (Bastos et al., 2017; Boligon et al., 2015; Erharuyi et al., 2014).

C. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante da fração aquosa do látex de *H. speciosa* foi avaliada através do método do sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil



(DPPH). A metodologia empregada foi adaptada de Sánchez-Moreno e colaboradores (1998). As amostras da fração aquosa do látex de mangabeira foram diluídas em água de osmose-reversa, resultando nas concentrações de 25 a 125 mg/mL. Em seguida, foram misturados 0,1 mL de cada solução com 3,9 mL de uma solução de DPPH a 60 uM. Após o tempo de incubação de 30 min à temperatura ambiente, as absorvâncias foram medidas a 515 nm ($A_{amostra}$). A amostra correspondente ao branco (A_{branco}) foi constituída por metanol sem DPPH. A solução controle ($A_{controle}$) utilizada foi composta por 3,9 mL de solução de DPPH e 0,1 mL de metanol. A atividade antioxidante de cada solução foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$Atividade\ antioxidante\ (\%) = 100 - \frac{(A_{amostra} - A_{branco}) \times 100}{A_{controle}}$$

A atividade antioxidante foi expressa como IC_{50} , a qual representa a concentração (mg/mL) da amostra-teste necessária para causar uma diminuição de 50% no conteúdo inicial da solução de DPPH. Os ensaios foram realizados em triplicata.

D. Atividade antibacteriana

Seguindo as diretrizes do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), a atividade antibacteriana da fração aquosa do látex de *H. speciosa* foi determinada pelo método de difusão em ágar, também conhecido como Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos ou TSA (CLSI, 2016). Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29231 e *Escherichia coli* ATCC 25312 foram suspensas em soro fisiológico 0,9%, ajustadas em 0,5 da escala de McFarland (Silva et al., 2012), e posteriormente, inoculadas na superfície de placas contendo ágar Mueller Hinton. Após inoculação, foram adicionados sobre o ágar, discos de papel de filtro impregnados com Gentamicina (antimicrobiano controle) e discos com 5µl da fração aquosa do látex de mangabeira. Finalmente, as placas foram incubadas em estufa a 36°C por 24 horas e o diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano foi medido utilizando-se régua milimetrada. Esse ensaio foi realizado em duplicata.

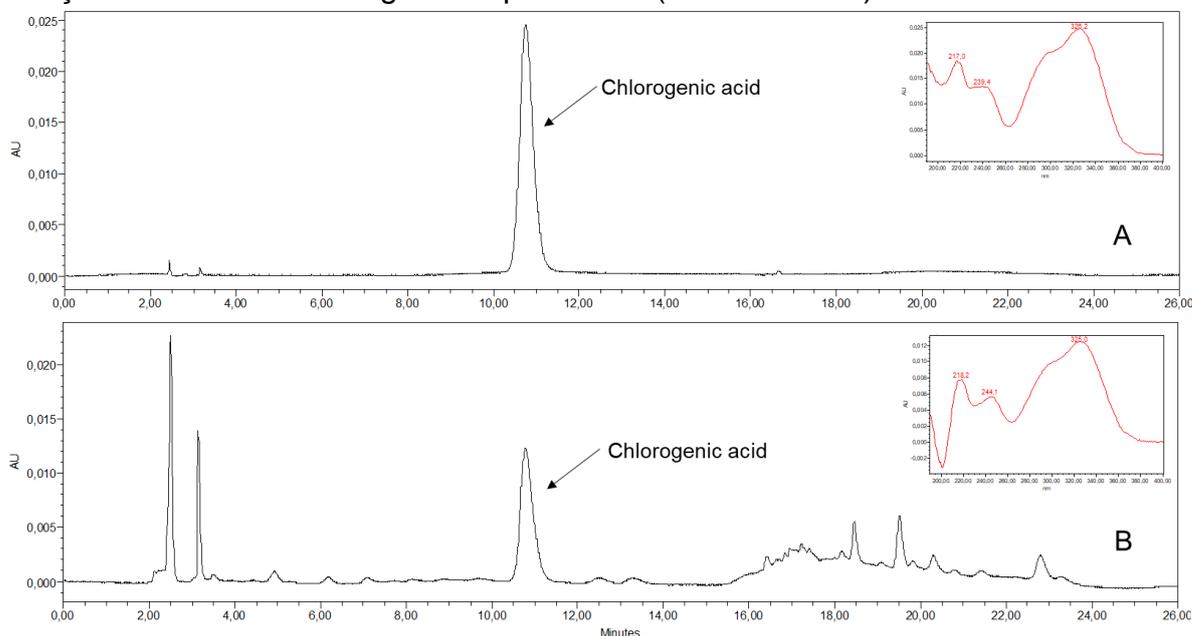


Resultados e Discussão

A. Cromatografia a líquido de Alta Eficiência (CLAE)

A fração aquosa do látex de mangabeira foi submetida à análise cromatográfica, a fim de se identificar metabólitos secundários que podem estar associados com a atividade angiogênica desse látex. Desta forma, a partir da análise qualitativa realizada foi possível identificar o ácido clorogênico na amostra avaliada. Esse composto foi confirmado a partir da comparação do tempo de retenção e do espectro de absorção UV com o padrão (como demonstra a Figura 1). O ácido clorogênico pertence à família dos fenóis, os quais têm sido descritos na literatura pelas suas atividades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Tais propriedades contribuem com a aceleração do processo regenerativo (Albuquerque et al., 2016; Ghuman et al., 2016).

Figura 1: Cromatogramas do ácido clorogênico (A, a 0,01 mg/mL) e da fração aquosa do látex de *H. speciosa* (B, a 500 mg/mL), a 330 nm e com os picos de absorção destacados ao longo do espectro UV (190 – 400 nm).



B. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante da fração aquosa do látex de *H. speciosa*, dada através



do método do sequestro do radical livre DPPH, foi avaliada mediante a comparação do IC_{50} dessa fração ($IC_{50} = 76.52$ mg/ml) com o de 4 controles positivos: hidroxitolueno butilado ($IC_{50} = 0.20$ mg/ml), hidroxianisol butilado ($IC_{50} = 0.09$ mg/ml), ácido tânico ($IC_{50} = 0.04$ mg/ml) e ácido ascórbico ($IC_{50} = 0.09$ mg/ml). Frente a esses resultados, pode-se observar que apesar da capacidade da fração aquosa de capturar radicais DPPH ser menor que a dos controles, essa fração foi capaz de sequestrar esses radicais, exibindo uma relevante atividade antioxidante, a qual tem extrema importância para o processo de regeneração de tecidos. Durante o processo de cicatrização de feridas, existe uma alta produção de espécies reativas de oxigênio, as quais podem causar um estresse oxidativo no tecido e culminar no retardamento da cicatrização tecidual (Lodhi; Singhai, 2013).

C. Atividade antibacteriana

O estudo da atividade antibacteriana da fração aquosa do látex de mangabeira foi realizado por meio do método de difusão em ágar. Visto que, a presença de microorganismos e suas toxinas em feridas acarreta o prolongamento do processo inflamatório e retardo do processo de cicatrização (Lodhi; Singhai, 2013), assegurar um ambiente livre de infecção bacteriana se torna crucial. Entretanto, os resultados demonstraram que a fração aquosa não apresentou atividade antibacteriana, uma vez que, não foi observada a formação de zona de inibição ao redor do disco de papel de filtro embebido com essa fração (Figura 2).

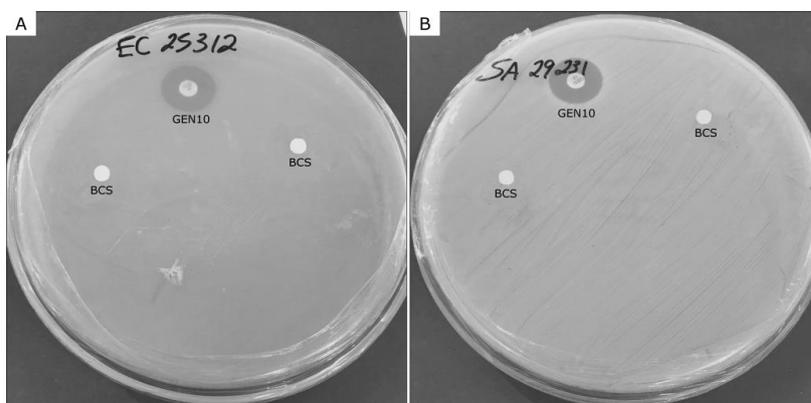


Figura 2: Teste de sensibilidade a antimicrobianos, onde a fração aquosa do látex de *H. speciosa* não apresentou atividade antibacteriana contra: A) *Escherichia coli* (ATCC 25312) e B) *Staphylococcus aureus* (ATCC 29231).



Considerações Finais

Neste trabalho foi realizado o fracionamento do látex de mangabeira e os dados obtidos demonstraram que a fração aquosa desse látex possui em sua constituição o ácido clorogênico, um composto fenólico capaz de acelerar o processo de regeneração de tecidos. Além disso, apesar de não ter apresentado atividade antibacteriana, a fração aquosa demonstrou ser capaz de capturar radicais livres, caracterizando assim, sua relevante atividade antioxidante, a qual pode contribuir no processo de cicatrização de feridas.

Agradecimentos

Agradecemos o suporte financeiro fornecido pelas agências de fomento: CAPES, FAPEG e UEG.

Referências

- ALBUQUERQUE, R.D.D.G. Wound healing activity and chemical standardization of *Eugenia pruniformis* Cambess. *Pharmacogn. Mag.*, v.12, n.48, 2016.
- ALMEIDA, L.M. et al. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v. 25, p. 2153-62, 2014.
- ARAÚJO, M.M.; MASSUDA, E.T.; HYPPOLITO, M.A. Anatomical and functional evaluation of tympanoplasty using a transitory natural latex biomembrane implant from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Acta Cir. Bras.*, v.27, n.8, p.566–71, 2012.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 26th Informational supplement. In: Document M100-S26. Wayne, PA: CLSI; 2016.
- CONCEIÇÃO, G.M. et al. Plantas do cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. *Scientia Plena*, v.7, n.12, p.1-6, 2011.
- COSTA, E.S. et al. Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants of the Cerrado, Brazil. *Phytother. Res.*, v.22, p.705–707, 2008.
- D'ABADIA, P.L. *Caracterização das frações do látex de Hancornia speciosa (Mangabeira): atividade angiogênica, expressão de genes e prospecção fitoquímica.*



2016. 65f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Cerrado), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2016.

FLORIANO, J.F. et al. Comparative study of bone tissue accelerated regeneration by latex membranes from *Hevea brasiliensis* and *Hancornia speciosa*. *Biomed. Phys. Eng. Express.*, v.2, n.4, p.1-15, 2016.

FRADE, M.A.C. et al. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. *An Bras. Dermatol.*, v.87, n.1, p.45-51, 2012.

GELLER, F.C. et al. Evaluation of the wound healing properties of *Hancornia speciosa* Leaves. *Phytother. Res.*, v.29, n.12, p.1887-93, 2015.

GHUMAN, S. et al. Antimicrobial activity, phenolic content, and cytotoxicity of medicinal plant extracts used for treating dermatological diseases and wound healing in kwazulu-natal, south africa. *Front. Pharmacol.*, v.7, p.320, 2016.

GRANDI, T.S.M. et al. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. *Acta Bot. Bras.*, v.3, n.2, p.185-224, 1989.

LODHI, S.; SINGHAI, A.K. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. on streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, v.6, n.4, p.253-259, 2013.

MALMONGE, J.A. et al. Comparative study on technological properties of latex and natural rubber from *Hancornia speciosa* Gomes and *Hevea brasiliensis*. *J. Appl. Polym. Sci.*, v.111, p.2986–2991, 2009.

MARINHO, D.G. et al. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *J. Ethnopharmacol.*, v.135, n.2, p.530–537, 2011.

MORAES, T.M. et al. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-Heliobacter pilori actions. *J. Ethnopharmacol.*, v.120, n.2, p.161-168, 2008.

NEVES, J.S. et al. Evaluation of the osteogenic potential of *Hancornia speciosa* latex in rat calvaria and its phytochemical profile. *J. Ethnopharmacol.*, v.183, p.151–158, 2016.

PELENOVA. Regedem® e Biocure, Pele Nova Tecnologia S.A. Disponível em: <[Http://www.pelenova.com.br/site](http://www.pelenova.com.br/site)>. Acesso em 02 de janeiro de 2017.

PEREIRA, A.C. et al. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. *J. Ethnopharmacol.*, v.161, p.30–35, 2015.



- RAULF, M. The latex story. *Chem. Immunol. Allergy*, v.100, p.248-255, 2014.
- RODRIGUES, A.G.; AMARAL, A.C.F. *Aspectos sobre o desenvolvimento da fitoterapia*. In: Ministério da Saúde. *Práticas integrativas e complementares: Plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica*. Brasília: Ministério da Saúde. p. 13-23. 2012.
- SAMPAIO, R.B. et al. Rabbit retinal neovascularization induced by latex angiogenic-derived fraction: an experimental model. *Curr. Eye Res.*, v.35, n.1, p.56-62, 2010.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric*, n.76, p.270-276, 1998.
- SANTOS, U.P. et al. Physicochemical Characterization, Microbiological Quality and Safety, and Pharmacological Potential of *Hancornia speciosa* Gomes. *Oxid Med Cell Longev*, v.2018, Article ID 2976985, 17 p., 2018.
- SILVA, G.C. et al. Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract. *Phytomedicine*, v.23, n.2, p.214–219, 2016.
- SILVA, S.M.F.Q. et al. Atividade in vitro de extratos brutos de duas espécies vegetais do Cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.17, n.6, p.1649- 1656, 2012.
- SMITH-HALL, C.; LARSEN, H.O.; POULIOT, M. People, plants and health: a conceptual framework for plant consumption. *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, v.8, p.43, 2012.
- SOARES, F.P. et al. Cultura da mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). *Boletim Agropecuário*, Lavras/MG, n.67, p.1-12, 2006.
- WU, M.; MCINTOSH, J.; LIU, J. Current prevalence rate of latex allergy: Why it remains a problem? *J. Occup. Health*, v.58, n.2, p.138-144, 2016.