

Eixo Temático: Biologia Aplicada

ET-09-006

INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE LECTINA NO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Persea americana*

Gisele Nayara Bezerra da Silva¹, Nabuêr Francieli da Silva¹, Rosângela Alves Falcão²

¹Pós-graduandas no curso de Especialização em Saúde Pública pela Universidade de Pernambuco - *Campus* Garanhuns/PE.

²Prof.^a. Dr.^a /Orientadora UPE, *Campus* Garanhuns/PE.

<http://dx.doi.org/10.21472/congrebio2016.et-09-006>

RESUMO

O uso de plantas medicinais está presente na cultura popular e tem servido de modelo para inúmeros fármacos, devido a quantidade de substâncias presentes nas mesmas. A espécie *Persea americana* conhecida popularmente como abacateiro pertence a família Lauraceae, onde a mesma é bastante empregada na indústria de cosméticos devido as propriedades que possui. A lectina, uma proteína que possui afinidade por carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos, pode ser encontrada em vegetais e em outros organismos, pois desempenha a função de proteção destes. O presente trabalho teve por objetivo investigar a possível presença de lectina no extrato aquoso das folhas de *Persea americana* e traçar o perfil proteico da mesma. Inicialmente já com o material coletado, foram preparados extratos aquosos da planta, a fim de se obter o melhor pH de extração da possível proteína. Além de outros testes como inibição por açúcar e dosagem proteica. O extrato mostrou-se capaz de aglutinar eritrócitos, na AHE o pH 6,0 foi onde ocorreu maior aglutinação. Diante dos resultados obtidos torna-se imprescindível o estudo aprofundado sobre a planta em questão bem como a confirmação da possível presença de lectina.

Palavras-chave: Plantas medicinais; Lectina; Fitoterapia.

INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, as plantas consideradas medicinais estão presentes no cotidiano do homem, como uma alternativa no tratamento de inúmeras patologias, onde todo o conhecimento empírico foi passado de pai para filho, estando presente em múltiplas culturas. No Brasil todo conhecimento sobre plantas foi difundido pelos indígenas através das gerações. Assim todo o domínio sobre ervas, formas de consumo deve-se ao fato de não somente estarem presentes em regiões propícias para tais práticas, mas também pela predominância cultural do repasse histórico do seu uso no cotidiano para os mais jovens, garantindo assim a continuidade deste hábito. O conhecimento dos indígenas e africanos em relação as plantas, foi passado para as gerações através da transmissão oral, que perdura até a atualidade e desperta gradativamente o interesse da ciência (Araújo et al., 2009).

Nas comunidades quilombolas o seu uso também está presente sob diversas formas de consumo, seja por ingestão ou uso tópico. Um dos fatores que possibilita a disseminação do conhecimento empírico é a biodiversidade de uma determinada localidade, onde os populares utilizam as espécies endêmicas presentes para uma série de finalidades. Porém com o crescente número de áreas devastadas, espécies que poderiam ser empregadas em pesquisas com o intuito de se estudar suas funções terapêuticas, podem ser comprometidas devido ao alto índice de desmatamento.

Dentre inúmeras plantas utilizadas pelos populares na medicina alternativa, destaca-se a espécie *Persea americana*, pertencente à família Lauraceae popularmente conhecida como abacateiro. O fruto é bastante utilizado na culinária devido as propriedades nutricionais, sendo um grande aliado na manutenção da saúde. O óleo do abacate possui grande quantidade de β -sitosterol e ácido oleico que auxiliam no combate ao colesterol alto (SALGADO et al., 2008). Além da sua aplicabilidade em diversos ramos como na área de cosméticos, o que desperta o interesse em pesquisas científicas voltadas para avaliação de seus compostos.

Os organismos vegetais possuem múltiplos compostos de interesse científico e farmacêutico, já que grande parte dos fármacos produzidos são à base de tais substâncias presentes nestes vegetais. As lectinas são proteínas com a capacidade de ligar-se a carboidratos encontrados na superfície dos eritrócitos. Estas possuem especificidade para os receptores presentes na superfície celular, assim provocando a aglutinação destes (ISIDRO et al., 2001). A mesma está presente em várias espécies vegetais, tendo como papel principal agir na defesa destes organismos contra outros invasores.

Tal proteína pode está localizada em várias partes da planta como em folhas, frutos, cascas e sementes, podendo ser encontrada em maior ou menor quantidade dependendo da parte da planta que está sendo utilizada. As lectinas estão presentes em organismos vegetais, e devido ao comportamento apresentado por estas proteínas as mesmas vêm adquirindo destaque sendo englobada em várias áreas do conhecimento (POVINELI e FINARDI, 2002). As mesmas possuem uma gama de funções, sendo empregadas em diversas finalidades. A aplicabilidade das lectinas é bastante diversa podendo ser utilizada em tipagem sanguínea, além de auxiliar na identificação de cepas de microrganismos (POVINELI e FINARDI, 2002). Com o uso crescente de plantas medicinais, torna-se imprescindível o estudo aprofundado das propriedades fitoterápicas destes vegetais, abordando um detalhamento maior das possíveis substâncias presentes nos mesmos, bem como a comprovação da sua eficácia no combate a doenças.

OBJETIVOS

O seguinte trabalho teve por objetivo investigar a possível presença de lectina no extrato aquoso das folhas de *Persea americana* e traçar o perfil da proteína em questão, além de verificar a presença da atividade hemaglutinante na mesma, identificar o melhor pH de extração, realizar a dosagem de proteica e identificar a qual carboidrato a possível proteína tem afinidade.

METODOLOGIA

Coleta do material

Foi realizada uma pesquisa com os populares residentes em três comunidades quilombolas situadas nas proximidades do município de Garanhuns – PE, onde foi verificado quais plantas os moradores utilizavam em seu cotidiano no tratamento de doenças. O projeto que visava o uso de plantas medicinais pelos moradores das comunidades, foi passado pelo Comitê de Ética através do seguinte número de descrição (CAAE No. 24906014.9.0000.5207). Com base nos resultados do questionário o material utilizado na pesquisa foi coletado em 2014 no município de Garanhuns-PE.

Secagem e armazenamento do material coletado

O material coletado foi posto para secar em estufa à temperatura de 40 °C, após o processo as folhas foram trituradas e armazenada no Laboratório de Biotecnologia e Inovação Terapêutica da Universidade de Pernambuco - *Campus* Garanhuns.

Descrição botânica

Para a descrição botânica foi feito a exsiccata da planta em questão e depositada no IPA, a fim de se obter o gênero e o epíteto específico da espécie.

Preparação do extrato aquoso

Para a preparação do extrato aquoso foram utilizados 10 g das folhas da planta em 100 mL dos respectivos tampões: citrato-fosfato pH 5,6; NaCl pH 7,0; NaPO₄ pH 8,2. Logo após foram postos em agitação em shaker *over night*. Após esse procedimento os extratos foram filtrados, centrifugados e armazenados.

Teste hemaglutinante

O teste hemaglutinante foi realizado segundo a metodologia aplicada por (Santos et al., 2013), em placas de microtitulação, sendo adicionados 50 µL de NaCl em todos os poços. A partir do 2° poço foi adicionado 50 µL do extrato aquoso, sendo feita a diluição seriada do respectivo extrato. Logo após foi adicionado 50 µL de sangue glutarizado em todos os poços. O mesmo ficou em repouso por 45 minutos em temperatura ambiente para a realização da leitura.

Avaliação do pH de extração

Para a preparação do extrato aquoso foram utilizados 2 g da planta em 20 mL de tampão, após a adição do material ao tampão, foi verificado o pH do extrato caso o mesmo necessitasse de ajuste. Os extratos foram postos em agitação em shaker por 6 horas. Logo após o procedimento houve nova verificação do pH, filtração do extrato e centrifugação do mesmo. Após centrifugação o pH do extrato foi verificado novamente, em seguida o mesmo foi armazenado. Para o seguinte teste foram utilizados 12 pH e dois tipos de tampões. Do pH 3,0 ao 5,0 utilizou-se o tampão acetato, do pH 5,5 ao 8,5 utilizou-se o tampão NaPO₄.

Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi realizado com o kit colorimétrico (*Kit Pierce BCA Protein Assay*). O teste foi feito em microplacas de titulação onde foram adicionados 25 µL do extrato já previamente diluído em água destilada, além da adição de 200 µL do reagente C presente no kit. A placa foi encubada por 30 minutos a uma temperatura de 37 °C. Após o período de espera houve a efetuação da leitura no leitor de microplacas a 562 nm. O seguinte procedimento foi realizado para a obtenção da hemaglutinante específica AHE (atividade hemaglutinante/proteínas mg/mL).

Teste de inibição por açúcares

A inibição por açúcares foi realizada em placas de microtitulação, onde as soluções de inibição foram compostas pelos carboidratos descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Carboidratos utilizados na inibição por açúcar.

Carboidrato usado	PM	Molaridade	Peso g	Solução usada
Glucose	180,15	0,4	0,072	NaCl 0,15M
Sacarose	342,3	0,4	0,1369	NaCl 0,15M
Frutose	180,16	0,4	0,072	NaCl 0,15M
Xilose	150,13	0,4	0,060	NaCl 0,15M

Os respectivos carboidratos foram diluídos em 1 mL de NaCl, sendo este o tubo n° 1. Para o tubo n° 2 foram colocados 800 µL de NaCl mais 800 µL da solução contida no tubo n° 1 para completar a solução do tubo n° 2. Na placa de microtitulação foram depositados 50 µL da solução do tubo n° 1 no 2° poço da placa. No 1° poço da placa foram depositados 50 µL da solução do tubo n° 2, bem como nos poços restantes. A partir do 2° poço da placa foram adicionados 50 µL do extrato aquoso da planta utilizada, sendo feita a diluição seriada do mesmo. Após 15 minutos foram adicionados 50 µL de sangue glutarizado em todos os poços. Após 45 minutos houve a efetuação da leitura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente o teste hemaglutinante foi realizado com três pHs iniciais: 5,6; 7,0; 8,2. Onde foi constatado que no pH 8,2 havia uma maior expressão da atividade hemaglutinante específica.

Tabela 2. Atividade hemaglutinante específica

Planta	Parte da planta	pH	Tampão	AHE
Abacateiro	Folha	5,6	Citrato-fosfato	2,8 UH/mg
Abacateiro	Folha	7	NaCl	9,13 UH/mg
Abacateiro	Folha	8,2	NaPO4	120,99 UH/mg

Nos extratos preparados para atividade de melhor pH de extração, também foi realizada a dosagem de proteína dos mesmos mostrando a quantidade de proteínas mg/mL em cada pH. Após finalização da dosagem de proteínas houve a realização do teste hemaglutinante dos extratos aquosos, para a definição da atividade hemaglutinante específica AHE (Tabela 3).

Tabela 3. AHE da avaliação do pH de extração.

Planta	Parte da planta	Tampão	pH	AHE
Abacateiro	Folha	Acetato	3	56,58 UH/mg
Abacateiro	Folha	Acetato	3,5	57,59 UH/mg
Abacateiro	Folha	Acetato	4	78,85 UH/mg
Abacateiro	Folha	Acetato	4,5	43,94 UH/mg
Abacateiro	Folha	Acetato	5	9,96 UH/mg
Abacateiro	Folha	NaPO4	5,5	23,66 UH/mg
Abacateiro	Folha	NaPO4	6	313,82 UH/mg
Abacateiro	Folha	NaPO4	6,5	88,01 UH/mg
Abacateiro	Folha	NaPO4	7	137,36 UH/mg
Abacateiro	Folha	NaPO4	7,5	218,51 UH/mg
Abacateiro	Folha	NaPO4	8	76,64 UH/mg
Abacateiro	Folha	NaPO4	8,5	197,92 UH/mg

Diante do teste realizado foi constatado que ocorreu maior aglutinação no pH 6,0. Para o teste de inibição por açúcar foram utilizados quatro tipos de carboidratos (glucose, sacarose, frutose, xilose). O teste foi realizado com o tipo sanguíneo "O" glutarizado. Diante do seguinte teste executado foi constatado que não houve ligação por nenhum dos carboidratos utilizados. Alguns estudos foram realizados com a espécie *Persea americana* com o intuito de identificar a propriedade de aglutinação além de identificar qual substância presente na espécie era responsável por tal propriedade. Estudos foram realizados por Meade et al., (1980) com o extrato das sementes da espécie, onde foi certificado a capacidade de realizar a aglutinação, outros testes foram realizados pelos autores onde foi confirmado que a substância presente no extrato não tinha especificidade por carboidratos e não se tratava de uma proteína.

Estudos a respeito de outros compostos presentes no fruto do abacateiro foram realizados por Gondim et al. (2005) fazendo-se um comparativo do teor de lipídeos presentes na casca e na poupa, em relação a outras frutas, havendo uma diferença significativa entre o abacate e as demais. Outros estudos também a respeito da presença de lipídeos além dos conteúdos de umidade foram feitos por Tango et al., (2004) havendo diferenças de acordo com a variedade dos frutos. Tais estudos reforçam a importância da empregabilidade do abacate na extração de óleo, podendo ser utilizado em cosméticos e na área alimentar, pois o mesmo é muito rico em nutrientes que auxiliam na saúde.

CONCLUSÕES

Diante dos procedimentos realizados e resultados obtidos fica claro a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre a planta bem como realização de outras atividades que esclareçam se há alguma outra substância presente no extrato que exerça a aglutinação dos eritrócitos. Em relação a inibição por açúcar não ficou claro se realmente há a presença de lectina no extrato já que não houve ligação por nenhum dos carboidratos testados. Portanto é necessário o teste com outros tipos de carboidratos e glicoproteínas para a verificação de ligação e possível confirmação da presença ou ausência de lectina.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A. C.; SILVA, J. P.; CUNHA, J. L. X. L.; ARAÚJO, J. L. O. Caracterização socio-econômico-cultural de raizeiros e procedimentos pós-colheita de plantas medicinais comercializadas em Maceió, AL. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 81-91, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v11n1/14.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2015.
- GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciê. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n4/27658>>. Acesso em: 28 abr. 2016.
- ISIDRO, R.; SALES, F. J. M.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; MOREIRA, R. A. Ação de lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. sobre o comportamento da saúva do nordeste, *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939. **Rev. Fac. Agron.**, v. 22, p. 77-86, 2001.
- MEADE, N. A.; STAAT, R. H.; LANGLEY, S. D.; DOYLE, R. J. Lectin-like activity from *Persea americana*. **Elsevier**, v. 78, n. 2, p.349-363, 1980.
- POVINELI, K. L.; FINARDI FILHO, F. As múltiplas funções das lectinas vegetais. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 24, p. 135-156, dez., 2002. Disponível em: <<http://www.revistanutrire.org.br/files/v24n%C3%BANico/v24nunicoa09.pdf>> Acesso em: 22. out. 2015.
- SALGADO, J. M.; DANIELI, F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; FRIAS, A.; MANSI, D. N. O óleo de abacate (*Persea americana* Mill) como matéria-prima para a indústria alimentícia. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, supl. 28, p. 20-26, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v28s0/04.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2015.
- SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; BEZERRA, R. F.; CARVALHO, E. V. M. M.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Strategies to obtain lectins from distinct sources. **Advances in Medicine and Biology**, v. 63, 2013.

TANGO, J. S.; CARVALHO, C. R. L.; SOARES, N. B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. **Rev. Bras. Fitic.**, v. 26, n. 1, p. 17-23, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v26n1/a07v26n1>>. Acesso em: 28. abr. 2016.