

Eixo Temático ET-09-013 - Biologia Aplicada

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DOS EXTRATOS AQUOSOS DA SEMENTE DE *Artocarpus heterophyllus* Lam.

Maria Emília Brito da Silva¹, Kaliana Mendes da Silva¹,
Sammara Drinny de Siqueira Correia¹, Nabuêr Francieli da Silva²,
Rosângela Alves Falcão³

¹Pós-Graduandas no Curso de Especialização em Saúde Pública pela Universidade de Pernambuco - *Campus* Garanhuns/PE; ²Mestranda do programa em Morfotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE; ³Prof^a. Dr^a /Orientadora UPE, *Campus* Garanhuns/PE.

RESUMO

As plantas medicinais foram e ainda são um dos recursos utilizados pelas populações, com o intuito de prevenir, diminuir e curar doenças, sendo utilizadas em todas as camadas de sociedade, algumas possuem uma proteína que tem a capacidade de ligar-se, reversivelmente, a carboidratos, por meio de sítios específicos em sua superfície celular, chamada de lectina, com funções como a detecção de grupos sanguíneos, diagnóstico de doenças e identificação de cepas de microrganismos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade hemaglutinante (AH), atividade hemaglutinante específica (AHE), melhor pH e a possível existência de lectinas no extrato aquoso da semente de *Artocarpus heterophyllus* Lam, planta pertence à família das Moraceae, popularmente conhecida como Jaqueira, uma árvore de grande porte, rica em nutrientes, encontrada no Nordeste brasileiro. Os testes hemaglutinantes (AH), foram feitos com soluções tamponadas. O ensaio para determinação da atividade hemaglutinante específica (AHE) foi realizado com *kit* *BCA protein*. Para o teste de melhor pH, foram feitos tampões com os pHs 3,0 até o 8,5 e em seguida realizadas AH e AHE. Por fim a inibição da AH com os carboidratos D-galactose, D-monose, lactose e D-glicose, para determinação do açúcar específico. Todos os testes foram feitos em triplicata. Os extratos apresentaram a capacidade de aglutinar eritrócitos humanos, indicando a possível presença de lectina. Os resultados iniciais demonstraram que a proteína apresentou uma melhor atividade em pH= 7,0, demonstrando sua especificidade ao perfil neutro, em AHE os melhores resultados foram obtidos em tampão 7,0, assim como em AH, ressaltando sua especificidade. Os resultados para melhor pH apresentaram-se sem muita variação, observou-se uma progressão em relação ao pH 3,0 até o 7,0, continuando a subir em comparação com pH ácido. O ensaio de inibição de AH apresentou resultado negativo para os açúcares testados. Poucos estudos demonstram o uso medicinal de *A. heterophyllus* L. estudos futuros devem ser realizados para definir suas propriedades terapêuticas e a presença de lectinas.

Palavras-chave: Plantas medicinais; Lectina; *Artocarpus heterophyllus* Lam.

INTRODUÇÃO

A utilização dos produtos oriundos da natureza é feita desde os primórdios das civilizações arcaicas, o homem tira seu sustento de produtos de origem natural, tanto

para alimentar-se, com a utilização da caça de animais e colheita de frutas e vegetais ou/e para o alívio de dores e recuperação das mais diversas enfermidades. As plantas medicinais foram e ainda são um dos recursos utilizados pelas populações com o intuito de prevenir, diminuir e curar doenças, sendo um dos principais recursos terapêuticos utilizados para os cuidados com a saúde pela população brasileira (BRASIL, 2012).

As plantas com atividades medicinais são sem dúvida um marco na origem das civilizações, permanecendo até os dias atuais, sendo estudadas quanto à origem de seus compostos ativos, pelo fato de serem encontradas com facilidade, devido à grande biodiversidade de vegetais presentes em todo território brasileiro. Segundo Cavalcante et al. (2013), o hábito de recorrer as propriedades curativas de algumas plantas foi uma das primeiras manifestações do homem em compreender e utilizar a natureza ao seu redor.

Existem plantas utilizadas pela população, para fins medicinais, que pouco se tem conhecimento sobre a maneira que as mesmas atuam no organismo humano. Com o avanço da ciência, os bioativos vegetais ganharam grande importância, por meio de pesquisas de identificação e isolamento de seus compostos químicos com atividade biológica, assim, ratificando-se a investigação da ação de plantas popularmente utilizada para fins curativos e terapêuticos.

A produção de fármacos a partir de produtos de origem natural, os chamados fitoterápicos, é regulamentada por meio da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, por meio do Decreto nº 5.813 de Junho de 2006, que garante o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações (BRASIL, 2006). De acordo Souza, Pereira e Fonseca (2012) as ações dessa Política são de fundamental importância para melhorar o acesso da população carente às plantas medicinais e fitoterápicos.

Entre as plantas com atividade medicinal a *Artocarpus heterophyllus* Lam vem sendo estudada, quanto ao seu potencial terapêutico. Essa planta pertence à família das Moraceae, popularmente conhecida como Jaqueira, uma árvore de grande porte, muito encontrada no Nordeste brasileiro, que possui grande importância farmacológica e econômica, devido ao seu fruto que é utilizado na forma *in natura* e é matéria prima para doces e também pode ser ingerido naturalmente, tendo um sabor doce e suave.

As lectinas são proteínas com capacidade de aglutinar eritrócitos humanos e animais, estão presentes tanto nos animais como também em vegetais. Segundo Sun et al. (*apud* FERNANDES, 2012) lectinas presentes nas sementes de leguminosas são mais estudadas, isoladas e investigadas em relação as suas propriedades físico/químicas, estruturais e biológicas do que as encontradas em animais. A investigação inicial para presença de lectinas é feita através do teste de atividade hemaglutinante, que identifica a capacidade de aglutinar eritrócitos, que é uma das principais características das lectinas, sendo fundamental a realização de outros testes laboratoriais para comprovar a existência da mesma, visto que outras proteínas também possuem essa capacidade.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade hemaglutinante, atividade hemaglutinante específica, identificar o melhor pH para extração e a possível existência de lectinas no extrato aquoso de sementes de *Artocarpus heterophyllus* Lam.

MATERIAS E MÉTODOS

Seleção da planta utilizada

A escolha da planta ocorreu a partir de pesquisas bibliográficas e de testes prévios com plantas medicinais, a jaca por apresentar melhores resultados, foi a escolhida para os testes mais específicos. A planta selecionada foi a *A. heterophyllus*, tombada pelo herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, com o número 80722. Somente as sementes foram utilizadas nos ensaios.

Preparação do extrato

Os extratos foram preparados com 10g do material triturado, acrescidos 100mL de tampão com três diferentes pHs,: pH 5,6 (tampão citrato fosfato 0,15M); pH 7,0 (solução de NaCl 0,15M) e pH 8,0 (tampão fosfato 0,15M). Em seguida colocados em agitação, *over night*, por 24h. Após esse tempo foram retirados e filtrados em gaze, centrifugados a 3000rpm por quinze minutos e armazenadas.

Atividade hemaglutinante (AH)

Foram adicionados 50µL de NaCl em todos os poços da placa de microtitulação e 50 µL da amostra a partir do segundo poço, seguindo-se uma diluição seriada. Após a diluição seriada, acrescido 50 µL de sangue humano glutarizado em todos os poços. Após o intervalo de 45 min, à temperatura ambiente de ~37 °C, foi possível fazer a leitura.

Melhor pH de extração

Para preparar o extrato pesou-se 2 g da planta para 20 mL de tampão, em seguida mediu-se novamente o pH da substância e logo depois colocado em shake de agitação. Após 16h de agitação, ocorreu a centrifugação a 3000 rpm, por 15 min e novamente a medição dos pHs, após esses procedimentos foram armazenados. Foram utilizados tampão fosfato de pHs: 5,0 até 8,5 e tampão acetato de pHs: 3,0 ao 4,5.

Atividade hemaglutinante específica (AHE)

A Atividade Hemaglutinante Específica – AHE foi realizada com os mesmos extratos utilizados em AH. A dosagem proteica foi feita com *kit BCA protein, albumina sérica bovina*. Dividiu-se a média da dosagem proteica (mg/ml) com a média da AH (atividade hemaglutinante/proteínas) e assim, obteve-se a AHE, considera-se o melhor resultado da AHE aquele que obteve o valor maior de AHE após a divisão.

Inibição da atividade hemaglutinante

Realizada em placa de microtitulação, onde as soluções de inibidor compostas dos carboidratos D-galactose, D-monose, lactose e D-glicose foram utilizados. Ocorreu a diluição dos açúcares em NaCl e logo após acrescentados nos poços da placa, utilizou-se 50µL do açúcar em todos os poços e em seguida acrescido 50µL do extrato e seguiu-se uma diluição seriada. Após o tempo de 45 min, a temperatura ambiente de ~37 °C, observou-se macroscopicamente a presença e/ou ausência da inibição da AH.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O resultado de AH é percebida a partir do número de poços onde não acontece a decantação das eritrócitos, quanto maior o número de poços onde não ocorre a decantação melhor o resultado. Os resultados iniciais demonstraram que a proteína apresentou uma melhor atividade em pH=7,0, demonstrando sua especificidade ao perfil neutro (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade hemaglutinante.

Tampão	pH	Resultado
CITRATO/ FOSFATO	5,6	10,6 UH/mg
NaCl	7,0	13,6 UH/mg
FOSFATO	8,2	2,0 UH/mg

As plantas do gênero *Artocarpus* são fontes importantes de proteínas, flavonoides, terpenoides e fitoesteroides (PEREIRA, 2013). A proteína KM+, uma lectina presente na semente da jaca (*Artocarpus integrifolia*), possui propriedades de induzir a migração de neutrófilos que são células do sangue e também tem efeito na reparação de tecidos (LEÃO, 2004). Lafont et al. (*apud* SELL e COSTA, 2000, p. 300) mostrou que a jacalina, proteína, extraída das sementes de *A. heterophyllus*, estimula linfócitos T CD4, que ao interagir em baixas concentrações com este receptor, inibe a infecção de células linfoides pelo vírus da imunodeficiência – HIV. O teor de proteínas do extrato é obtido por meio da AHE (Tabela 2), observa-se que, assim como visto em AH, os melhores resultados foram obtidos em tampão 7,0, ressaltando sua especificidade.

Tabela 2. Atividade hemaglutinante específica.

Tampão	pH	Resultado
CITRATO/ FOSFATO	5,6	507.5 UH/mg
NaCl	7,0	576.0 UH/mg
FOSFATO	8,2	86.7 UH/mg

Os resultados obtidos para a AH com a variação de pH do 3,0 ao 8,0 (tabela 3), apresentam-se sem muita variação, observou-se uma progressão em relação ao pH 3,0 até o 7,0, continuando a subir em comparação com pH ácido (3,0), demonstrando que a planta desempenha melhor atividade pH básico.

Tabela 3. AH com diferentes pH's de extração.

pH	Resultado
3,0	256 UH/mg
3,5	1,7 UH/mg
4,0	2,0 UH/mg
4,5	2,0 UH/mg
5,0	27,3 UH/mg
5,5	26,0 UH/mg
6,0	22,0 UH/mg
6,5	27, 3 UH/mg
7,0	21, 8 UH/mg
7,5	38,2 UH/mg
8,0	65, 5 UH/mg

Segundo Sell e Costa (2000) a lectina encontrada na semente da jaca (*A. integrifolia*) é específica para D-galactose, no entanto a inibição da AH em *A. heterophyllus* apresentou resultado negativo para todos os carboidratos testados, inclusive para D-galactose e para os demais D-monose, lactose e D-glicose, divergindo de outros resultados encontrados na literatura que avaliaram os mesmos inibidores. Acredita-se que isso ocorreu devido a concentração dos açúcares utilizados neste estudo. Podemos concluir que não foram encontrados açúcares com especificidade para as lectinas da planta, nas concentrações de inibidores empregadas, assim mais ensaios devem ser realizados com concentrações mais elevadas.

CONCLUSÕES

Poucos estudos na literatura demonstram o uso medicinal de *Artocarpus heterophyllus* Lam., notou-se com o presente trabalho que existe uma grande possibilidade da presença de lectinas em sua semente conforme indicam os resultados preliminares encontrados, corroborando com os diversos relatos sobre a presença dessa proteína, a nível taxonômico de gênero na espécie estudada. Devido ao fato de não existir na literatura registros que indiquem a existência de lectinas na espécie estudada, enfatiza-se que são necessários estudos mais específicos para confirmação dos resultados encontrados neste estudo.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Práticas Integrativas e Complementares: Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília, DF, 2012.

CAVALCANTE, G. M.; NETO, J. F. L.; BOMFIM, E. O.; SANTOS, M. F. Atividade antimicrobiana de *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) sobre o desenvolvimento de *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*. **Scientia Plena**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 2013.

FERNANDES, A. V. **Caracterização bioquímica e avaliação da atividade antifúngica de lectinas de sementes de Fabaceae da Amazônia.** 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus - AM.

SELL, A. M.; COSTA C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 297-303, 2000.

SOUZA, M. R. M.; PEREIRA, R. G. F.; FONSECA, M. C. M. Comercialização de plantas medicinais no contexto da cadeia produtiva em Minas Gerais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 14, n. esp, p. 242-245, 2012.

PEREIRA V. J.; KAPLAN, M. A. C. **Artocarpus**: um gênero exótico de grande bioatividade. Rio de Janeiro: Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, fev. 2013.