



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

JOANA FILOMENA MAGALHÃES LEITE

PROPRIEDADES BIOATIVAS E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
UMA LECTINA PURIFICADA A PARTIR DE SEMENTES DE *Clitoria*
***fairchildiana* R. A. HOWARD**

FORTALEZA

2012

JOANA FILOMENA MAGALHÃES LEITE

PROPRIEDADES BIOATIVAS E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA
LECTINA PURIFICADA A PARTIR DE SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana* R. A.
HOWARD

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

Coorientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Tatiane Santi Gadelha.

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- L553p Leite, Joana Filomena Magalhães .
Propriedades bioativas e caracterização bioquímica de uma lectina purificada a partir de sementes de *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard / Joana Filomena Magalhães Leite. – 2013.
86f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Profa. Dra. Tatiane Santi Gadelha.
1. Glicoproteína. 2. Atividade antiinflamatória. 3. atividade antinociceptiva. I. Título.

CDD 574.192


JOANA FILOMENA MAGALHÃES LEITE

PROPRIEDADES BIOATIVAS E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA
LECTINA PURIFICADA A PARTIR DE SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana* R. A.
HOWARD

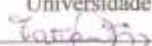
Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Ceará como
requisito para obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica

Aprovada em: 20/06/2012.


BANCA EXAMINADORA



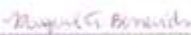
Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)




Prof. Dr. Tatiane Santi Gadelha (Coorientadora)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Raquel Guimarães Benevides
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Alana de Freitas Pires
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Josemar e Elzimar.

À minha filha, Thaís.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por está sempre caminhando comigo e dando-me força para vencer obstáculos.

Aos meus orientadores, Professor Benildo Sousa Cavada pela oportunidade dada e ensinamentos proporcionados e Professora Tatiane Santi Gadelha pelos ensinamentos, oportunidades e amizade. Serei sempre grata a vocês.

Ao CNPq pelo apoio financeiro colaborando com a concretização deste trabalho.

A Universidade Federal do Ceará e ao programa de Pós-graduação pela oportunidade cedida, bem como à Universidade Federal da Paraíba onde foi desenvolvido parte deste trabalho.

Aos professores Carlos Alberto de Almeida Gadelha, Eleonidas Moura Lima e Hilzeth de Luna Freire Pessoa, todos da Universidade Federal da Paraíba, por todo apoio dado para o melhor desenvolvimento deste trabalho, bem como pela amizade e disposição.

À Professora Daniela Priscila Marchi Salvador da Universidade Federal da Paraíba pela colaboração com resultados e disponibilidade para responder questionamentos.

Ao Professor Celso Shiniti Nagano da Universidade Federal do Ceará pela dedicação e atenção prestada.

À professora Ana Maria Assrey e a todos os estagiários do Laboratório de Fisiologia Farmacologia da Inflamação (LAFFIN), em especial ao Pedro Bringel, Mário e Alana pela enorme contribuição prestada e por sempre estarem à disposição.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (BioGeR), Normando, João Ricardo e Maria Rita, por todo apoio e amizade. Como também aos amigos e colegas do referido local de trabalho: Vinícius, Maria Clerya, Gregório, Carol, Maria Emília, Luciana, Paula, Jota e Elba.

Ao meu grande amigo e companheiro de laboratório (BioGeR), meu braço direito Rodrigo Rodrigues e Lacerda, muito obrigada por toda ajuda prestada, por está sempre à disposição. Você foi muito importante para a execução deste trabalho.

À Raquel Benevides do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab) por está sempre disposta a ajudar, pelos ensinamentos, que não foram poucos, pela amizade e paciência.

Aos amigos Rafael, Helton e Júnior (BioMol-Lab) pela companhia nos momentos difíceis, nos momentos de estudo e de descontração. Agradeço também aos amigos Maria Júlia, Eduardo, Thales, Ito, Emanuel e Márcia Marinho, Sâmia, Camila, Alfa, Raniere, Rômulo, Arthur, Alysso, Suzete, Bruno Lopes, Mayron, Theodora, Thaiz, Claudener, Guilherme, Fernando e Kássia e aos professores Bruno e Kyria.

À minha filha, Thaís Magalhães L. Leite pela compreensão da ausência, paciência na espera e a certeza do amor na volta.

Aos meus pais, Josemar e Elzimar pelo incentivo, apoio incondicional, amor e orações. Sem vocês nada disso seria possível.

À minhas irmãs, Juliana, Janayra, Jamile e Jossuely, pelo apoio, auxílio no cuidado e educação da minha filha e pela credibilidade.

Ao meu namorado, Marcílio, pelo incentivo dado nos momentos mais difíceis, por ser meu refúgio, minha alegria, por sempre dar-me força e acreditar em mim.

Enfim, a todos que fizeram parte, direta ou indiretamente, desta caminhada.

RESUMO

Lectinas são proteínas que tem a capacidade de se ligar especificamente e reversivelmente a carboidratos e glicoconjugados, sem alterar a estrutura do ligante. Elas são encontradas em organismos tais como vírus, bactérias, plantas e animais, e tem sido demonstrado que possuem atividades biológicas importantes. *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard é uma espécie pertencente à família Fabaceae, nativa da América do Sul. O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar uma lectina presente em sementes de *Clitoria fairchildiana*, avaliar o potencial fitoterápico e farmacológico (antinociceptivo, pró e antiinflamatório, hemolítico, antibacteriano e antifúngico) desta lectina. Os resultados indicaram a presença de uma lectina (CFAL) na fração proteica glutelina ácida, que aglutina eritrócitos de coelho nativos, a qual não foi inibida por monossacarídeos e glicoproteínas testadas, foi purificada por cromatografia em coluna de troca-iônica, DEAE-Sephacel. Análise da lectina em SDS-PAGE indicou duas bandas com massa molecular de aproximadamente 100 e 116 kDa. As análises em DLS apresentam uma amostra monomodal com raio hidrodinâmico (R_H) de 4,5 nm, indicando uma conformação dependente de alta concentração salina. A CFAL é uma glicoproteína PAS (+) capaz de ser inativada pelo tratamento com metaperiodato de sódio, porém resistente ao efeito de β -mercaptoetanol e uréia. Esta lectina não apresentou citotoxicidade significativa não alterou a fragilidade osmótica, bem como não apresentou efeitos oxidante/antioxidante significativos frente a hemácias humanas. A lectina apresentou atividade anti-inflamatória em modelo de edema da pata induzido por carragenina, com diminuição de 71% do edema. Efeitos antinociceptivos dose dependentes foram observados para CFAL no teste de contorções abdominais induzida por ácido acético, com redução do número de contorções em até 72%. A lectina de *C. fairchildiana* foi capaz de reduzir o crescimento de *Bacillus subtilis* e não afetou o crescimento dos fungos testados. Concluiu-se que a lectina purificada e caracterizada a partir das sementes de *Clitoria fairchildiana* é uma glicoproteína desprovida de pontes dissulfeto com atividade antiinflamatória e antinociceptiva e não é citotóxica para eritrócitos humanos.

Palavras-chave: *Clitoria fairchildiana*, lectina, glicoproteína, atividade antiinflamatória.

ABSTRACT

Lectins are proteins that have the ability to bind specifically and reversibly to carbohydrates and glycoconjugates, without changing the structure of binder. They are found in organisms such as virus, bacterias, plants and humans, and has been shown to possess important biological activities. *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard is a species belonging to the Fabaceae family, native to South America. The purpose of this study was to isolate and to characterize a lectin present in seeds of *Clitoria fairchildiana*, evaluate the herbal and pharmacological potential (antinociceptive, pro-and anti-inflammatory, hemolytic, antibacterial and antifungal) of this lectin. The results indicated the presence of a lectin (CFAL) on protein fraction acid glutelin, CFAL binds native rabbit erythrocytes, was not inhibited by monosaccharides and glycoproteins tested and was purified by ion exchange chromatography, DEAE-Sephacel. Analysis of the lectin in SDS-PAGE showed two bands with molecular mass approximately 100 and 116 kDa. In DLS analyzes have a monomodal sample with hydrodynamic radius (RH) of 4.5 nm, showing a conformation high salt concentration dependent. The CFAL is a glycoprotein PAS (+) capable of being inactivated by treatment with sodium metaperiodate, but resistant to the effect of β -mercaptoethanol and urea. This lectin did not show significant cytotoxicity, did not change the osmotic fragility and not showed oxidant/antioxidant significant effects, compared to human erythrocytes. The lectin showed anti-inflammatory activity in models of paw edema induced by carrageenan, decreasing 71% of edema. Dose dependent antinociceptive effects were observed for CFAL on abdominal writhing test induced by acetic acid, reducing the number of writhes in up to 72%. The *C. fairchildiana* lectin was able to reduce the growth of *Bacillus subtilis* and did not affect growth of the fungi tested. It was concluded that the lectin purified and characterized from the seeds of *Clitoria fairchildiana* is a glycoprotein lacks disulfide bonds with antinociceptive and antiinflammatory activity, and is not cytotoxic to human erythrocytes.

Keywords: *Clitoria fairchildiana*, lectin, glycoprotein, antiinflammatory activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>C. fairchildiana</i> R. A. Howard.....	19
Figura 2 – Perfil de eluição da lectina de <i>C. fairchildiana</i>	49
Figura 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS a 12,5% corado do Comassie Brilliant Blue.....	51
Figura 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS marcada com ácido periódico de Schiff. Linha A: fetuína suína; linha B: lectina de <i>C. fairchildiana</i>	52
Figura 5 - Distribuição da amostra de CFAL no Espalhamento Dinâmico de Luz sem força iônica (NaCl 0%).....	53
Figura 6 - Distribuição da amostra de CFAL no Espalhamento Dinâmico de Luz em uma concentração salina de 25% (NaCl).....	54
Figura 7 - Distribuição da amostra de CFAL no Espalhamento Dinâmico de Luz em uma concentração salina de 50% (NaCl).....	54
Figura 8 - Distribuição da amostra de CFAL no Espalhamento Dinâmico de Luz em uma concentração salina de 75% (NaCl).....	55
Figura 9 - Distribuição da amostra de CFAL no Espalhamento Dinâmico de Luz em uma concentração salina de 100% (NaCl).....	55
Figura 10 – Efeito anti-nociceptivo da lectina de <i>C. fairchildiana</i>	61
Figura 11 – Efeito antiinflamatório da lectina de <i>C. fairchildiana</i>	63
Figura 12 – Fragilidade Osmótica da Lectina de sementes de <i>C. fairchildiana</i>	65
Figura 13 – Efeito da lectina de <i>C. fairchildiana</i> sobre o crescimento bacteriano.....	68
Figura 14 - Interação da CFAL marcada com FITc á parede celular do fungo <i>Trichopyton rubrum</i> observado em microscópio invertido.....	70
Esquema 1 - Fracionamento por solubilidade proteica das sementes de <i>Clitoria fairchildiana</i>	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal das sementes de <i>Clitoria fairchildiana</i> referente à 100g de farinha.....	48
Tabela 2 – Atividade específica da lectina de <i>C. fairchildiana</i> após etapas de purificação.....	50
Tabela 3 – Efeito do EDTA e dos íons divalentes Ca^{+2} e Mn^{+2} sobre atividade hemaglutinante da lectina de <i>C. fairchildiana</i> (CFAL).....	57
Tabela 4 – Efeito dos agentes desnaturante, redutor e oxidante sobre a atividade hemaglutinante da lectina de <i>C. fairchildiana</i> (CFAL).....	58
Tabela 5 – Efeito da variação pH sobre a atividade hemaglutinante da lectina de <i>C. fairchildiana</i> (CFAL).....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ASC	área sobre a curva
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BanLec	lectina de <i>Musa acuminata</i>
BmLec	lectina de <i>Bothrops moojeni</i>
CCT	Coleção de Culturas Tropicais
CFAL	lectina de sementes de <i>C. fairchildiana</i>
CIM	concentração inibitória mínima
ConA	lectina de <i>Canavalia ensiformes</i>
DEAE	dietilaminoetil
DLS	espalhamento dinâmico de luz
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-ácético
FITC	isotiocianato de fluoresceína
Hb	hemoglobina
HC ₅₀	concentração hemolítica média
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência tipo 1
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
metHb	metahemoglobina
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PAS	ácido periódico de Schiff
PGE ₂	prostaglandina
PH	fenilhidrazina
PHA	fitohemaglutinina
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido Tricloroacético
UFC	unidades formadoras de colônias
UH	Unidade Hemaglutinante

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	<i>Clitoria fairchildiana</i> R. A. Howard.....	19
2.2	Lectinas.....	21
2.2.1	<i>Conceituando lectinas.....</i>	21
2.2.2	<i>Funções das lectinas vegetais x propriedades biológicas.....</i>	22
2.2.2.1	Atividade antinociceptiva.....	23
2.2.2.2	Atividade antiinflamatória.....	25
2.2.2.3	Atividade antifúngica.....	26
2.2.2.4	Atividade antibacteriana.....	27
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo Geral.....	29
3.2	Objetivos Específicos.....	29
4	METODOLOGIA.....	30
4.1	Composição centesimal das sementes de <i>C. fairchildiana</i>.....	30
4.1.1	<i>Determinação do teor de umidade.....</i>	30
4.1.2	<i>Determinação do teor de cinzas.....</i>	30
4.1.3	<i>Determinação de nitrogênio total.....</i>	31
4.1.4	<i>Determinação do teor de lipídeos.....</i>	31
4.1.5	<i>Carboidratos.....</i>	31
4.2	Purificação da lectina de <i>C. fairchildiana</i>.....	32
4.2.1	<i>Coleta e preparo da amostra.....</i>	32
4.2.2	<i>Eritrócitos.....</i>	32
4.2.3	<i>Fracionamento protéico.....</i>	32
4.2.4	<i>Ensaio de atividade hemaglutinante.....</i>	34
4.2.5	<i>Determinação de proteínas solúveis.....</i>	34
4.2.6	<i>Purificação da lectina de <i>C. fairchildiana</i> (CFAL).....</i>	34
4.2.7	<i>Especificidade da lectina a açúcares e glicoproteínas.....</i>	34
4.2.8	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β-mercaptoetanol (SDS-PAGE).....</i>	35
4.2.9	<i>Identificação de glicoproteínas.....</i>	36
4.2.9.1	Teste de Molisch.....	36
4.2.9.2	Teste de Schiff.....	36
4.2.9.3	Determinação de carboidratos solúveis.....	36
4.3	Caracterização físico-química da CFAL.....	37
4.3.1	<i>Efeito do EDTA e de cátions divalentes.....</i>	37
4.3.2	<i>Efeito do agente desnaturante uréia.....</i>	37
4.3.3	<i>Ação do agente redutor β-mercaptoetanol.....</i>	37
4.3.4	<i>Ação do agente oxidante metaperiodato de sódio.....</i>	38
4.3.5	<i>Efeito da variação de pH.....</i>	38
4.3.6	<i>Resistência da CFAL à hidrólise enzimática.....</i>	38
4.3.7	<i>Termoestabilidade.....</i>	38
4.3.8	<i>Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....</i>	39
4.4	Atividades Biológicas da CFAL.....	39
4.4.1	<i>Modelos de nocicepção em camundongos.....</i>	39
4.4.1.1	Teste de contorções abdominais.....	39
4.4.1.2	Teste da formalina.....	40

4.4.2	<i>Modelos de inflamação em ratos.....</i>	40
4.4.2.1	Edema de pata.....	40
4.4.2.2	Peritonite.....	41
4.4.3	<i>Tratamento estatístico utilizado no estudo nociceptivo e inflamatório.....</i>	41
4.4.4	<i>Ensaio de citotoxicidade potencial da CFAL em eritrócitos humanos.....</i>	41
4.4.5	<i>Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos frente à CFL.....</i>	41
4.4.6	<i>Avaliação do potencial oxidante e antioxidante da CFAL em eritrócitos humanos.....</i>	42
4.4.7	<i>Atividade antibacteriana.....</i>	43
4.4.7.1	Determinação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco.....	43
4.4.7.2	Determinação da atividade antibacteriana pelo método de microdiluição.....	44
4.4.8	<i>Atividade antifúngica.....</i>	44
4.4.8.1	Determinação da atividade antifúngica pelo método de difusão em disco.....	44
4.4.8.2	Determinação da atividade antifúngica pelo método de microdiluição.....	45
4.4.8.3	Visualização de lectina de <i>C. fairchildiana</i> em esporos fúngicos.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	Composição centesimal das sementes de <i>C. fairchildiana</i>.....	47
5.2	Purificação da lectina de <i>C. fairchildiana</i>.....	48
5.3	Caracterização físico-química da CFAL.....	52
5.4	Atividade antinociceptiva da CFAL.....	60
5.5	Atividade inflamatória.....	62
5.6	Atividade hemolítica e fragilidade osmótica.....	64
5.7	Ação oxidante e antioxidante em eritrócitos humanos.....	66
5.8	Atividade antibacteriana.....	67
5.9	Atividade antifúngica.....	69
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	APÊNDICE A - Resumos e trabalhos desenvolvidos durante o doutorado.....	86

1 INTRODUÇÃO

A cada ano, investimentos crescentes vêm sendo feitos para descoberta de novos fármacos. Uma parcela considerável destes medicamentos em desenvolvimento são produtos biotecnológicos. No Brasil, os produtos biotecnológicos estão incluídos em diferentes programas do governo com interesse a disponibilização no mercado, porém com comprovação de sua eficácia e segurança. Para comprovação da eficiência e eficácia dos produtos biotecnológicos é fundamental a realização de estudos preliminares sobre seu princípio ativo. A ANVISA em 2011 publicou nota técnica sobre produtos biológicos citando a importância do estudo destes desde a sua origem celular, processo produtivo, parâmetros de qualidade até estudos não clínicos e clínicos.

A maioria das substâncias orgânicas conhecidas são encontradas na natureza, no entanto é o Reino Vegetal o maior contribuinte de compostos úteis ao tratamento de patologias que acometem seres humanos. (PHILLIPSON e ANDERSON, 1898). Os produtos naturais têm sido utilizados por milênios no tratamento e na cura de diversas enfermidades. Segundo Echevarri *et al.* (2002), a utilização popular de plantas medicinais contribui de forma relevante para a divulgação das ações terapêuticas dos produtos vegetais, frequentemente indicados, pelos efeitos que promovem, apesar de não terem sua composição química definida. Embora atualmente este uso esteja sendo substituído pelo uso de medicamentos convencionais, há um ressurgimento do interesse na utilização de produtos naturais pelo público em geral, gerando um ramo comercial muito lucrativo.

Motivada, em parte, pela descoberta de quimioterápicos, a indústria farmacêutica reviveu o interesse por fármacos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, que dificilmente podem ser obtidas por um processo sintético de baixo custo (MONTANARI e BOLZANI, 2001). A seleção de extratos vegetais para a descoberta de novos compostos com atividades biológicas é uma fonte considerável para o desenvolvimento de fármacos mais efetivos (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia (GEBHARDT, 2000).

Dentre os compostos biológicos podemos destacar as lectinas, que são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune contendo pelo menos um domínio não catalítico de ligação específica e reversível a carboidratos (PEUMANS e VAN DAMME, 1995; BEUTH *et al.*, 1995). Estas proteínas são distribuídas em plantas, animais e microrganismos. Em leguminosas, estas proteínas representam cerca de 10% do nitrogênio total das sementes, tornando-se assim um produto de pesquisa em potencial. Embora tenham sido descobertas no século XIX, atualmente estas moléculas são de fundamental importância e podem ser consideradas como insumos básicos em biotecnologia.

Glicoproteínas, glicolipídios, glicosaminoglicanos e âncoras glicosilfosfatidilinositol são moléculas contendo carboidratos, que usualmente recobrem a superfície de células, sendo o domínio glicídico considerado um mediador de mecanismos envolvidos em interações célula-célula e molécula-célula. Com a comprovação de que as lectinas agem como mediadores do reconhecimento celular em uma diversidade de sistemas biológicos, como os de adesão a vírus, bactérias e protozoários às células hospedeiras, como também de leucócitos às células endoteliais e a interação células-matriz extracelular aumentou o interesse pelo estudo do papel destas biomoléculas tornando-as importantes ferramentas em glicobiologia devido à diversidade de eventos que podem transcorrer posteriores a interação lectina-carboidrato.

Muitas atividades biológicas de lectinas já foram identificadas, porém os mecanismos de ação ainda não são completamente entendidos. Acredita-se que provavelmente ocorre por meio de alguma cascata de sinalização celular que é ativada como resposta à ligação lectina-carboidrato. Entre as lectinas que apresentam atividades biológicas já estudadas destacam-se as lectinas de sementes de *Dioclea violacea* e *Dioclea grandiflora* que foram capazes de causar apoptose das células T e inflamação (BARBOSA *et al.*, 2001). Estas proteínas têm sido usadas como ferramentas para o estudo de processos antiinflamatório e pró-inflamatório (ASSREUY *et al.*, 2003, ALENCAR *et al.*, 2005, MOTA *et al.*, 2006, SANTI-GADELHA, *et al.* 2006). Atividades biológicas também foram descritas para a lectina de *Erythrina cristagalli* a qual apresenta efeito mitogênico em linfócitos humanos (TURTON *et al.*, 2004), a lectina de *Capsicum annuum* que é capaz de inibir a germinação dos esporos dos fungos (KUKU *et al.*, 2009), lectinas de *Alipinia zerumbet*, *Canavalia ensiformis* (ConA) e

Phaseolus vulgaris (PHA) que apresentam atividade mitogênica (WONG *et al.*, 2010). A lectina de *Luetzelburgia auriculata* apresenta atividade antiinflamatória, que age inibindo o rolamento de leucócitos e modulando a liberação de histamina e PGE2 (ALENCAR *et al.*, 2010). *Musa acuminata* (BanLec) são capazes de inibir a replicação do HIV-1 (SWANSON *et al.*; 2010) e as lectinas do veneno da serpente *Bothrops leucuris* mostrou-se capaz de inibir o crescimento de bactérias patogênicas (NUNES *et al.*, 2011).

Outras lectinas tem sido utilizadas como ferramenta para o estudo de atividade analgésica (SAYAH *et al.*, 2004), efeitos insulino-miméticos (CAVADA *et al.*, 2001), na investigação de estrutura de proteínas e carboidratos em células (SILVA *et al.*, 2000), na utilização em matrizes comerciais empregadas na purificação e caracterização de polissacarídeos e glicoconjugados (LIMA *et al.*, 1997), na caracterização de grupos sanguíneos (LIS e SHARON, 1998), nos estudos de oncogênese (SHARON e LIS, 2004) e como agente contra a ação de fungos, bactérias e insetos (GAIDAMASHVILI e STADEN, 2002). Alguns estudiosos, tomando como base o comportamento dessa substância, propõem aplicações futuras como a vetorização de fármacos a sítios específicos do corpo (BARREIRO, 2007) e a associação de lectinas com lipossomas permitindo a passagem pelo trato digestório sem sofrer grandes modificações (ANDRADE *et al.*, 2004) induzindo uma liberação continuada da lectina no organismo gerando uma constante presença do seu benefício terapêutico.

As sementes de *Clitoria ternatea* possuem uma lectina que apresenta especificidade por galactose e N-acetilgalactosamina, sendo uma possível ferramenta no estudo de compostos com ação anticancerígena (NAEEM, HAQUE e KHAN, 2007). É importante colocar que lectinas pertencentes ao mesmo gênero vegetal podem apresentar especificidade a açúcares semelhantes, mas potencialidades biológicas diferentes, em função de modificações estruturais que possam ter sofrido.

Apesar da espécie *C. fairchildiana* não ser utilizada para fins medicinais, outras espécies do gênero possuem uso medicinal tradicional na Índia e África como sendo diuréticas, catárticas, e expectorante (NAEEM, HAQUE e KHAN, 2007). Diversas partes da *C. ternatea* apresentaram-se como sendo antiinflamatória, analgésica, antipirética e imunomoduladoras (MUKHERJEE *et al.*, 2008). Esta espécie exibiu também efeitos hepatoprotetor e antihiperlipêmico (SOLANKI e JAIN, 2010, 2011). Na Índia, *C. ternatea* é amplamente

utilizada para fins medicinais. Estudo desenvolvido com extrato aquoso desta espécie identificou um considerável potencial antioxidante deste vegetal (RAO *et al.*; 2009).

A espécie *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard é uma espécie nativa das regiões Norte e Nordeste do Brasil conhecida vulgarmente como sombreiro. Encontra-se amplamente distribuída nas regiões Sudeste e Nordeste devido sua utilização principalmente no processo de arborização urbana, rural e de reflorestamento de áreas devastadas.

Tendo em vista a escassez de dados na literatura sobre compostos químicos purificados de *C. fairchildiana* e sendo esta pertencente a um gênero com tradicional utilização na medicina popular, faz-se importante a investigação da presença de produtos químicos que possam exercer alguma ação farmacológica considerável. Adicionalmente, a purificação de novas lectinas e a verificação de possíveis atividades biológicas revelam propriedades que podem ser de grande importância na pesquisa biomédica e farmacológica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard

É uma planta nativa da América do Sul, no Brasil predominando nas Regiões Norte e Nordeste. Espécie pertencente à família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Clitoriinae e gênero *Clitoria*, (USDA – ARS, 1997). Esta espécie vegetal é utilizada na arborização urbana sendo popularmente conhecida por sombreiro, mas também apresenta outros nomes populares como palheteira, faveira e sombra-de-vaca.

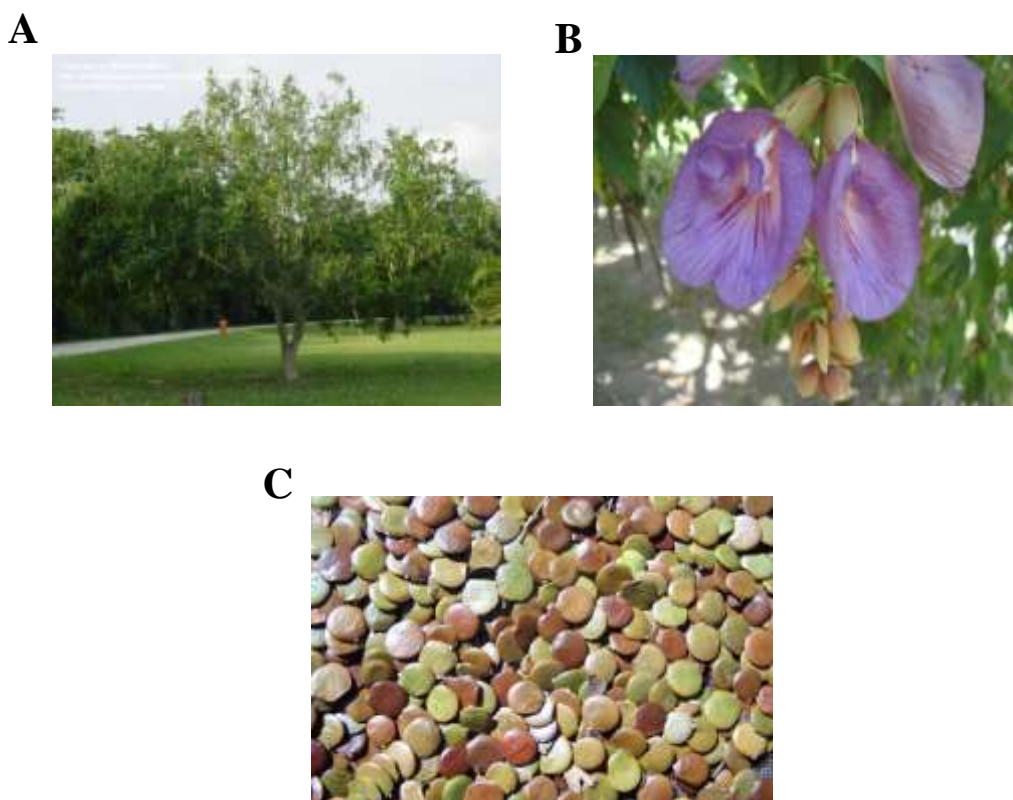


Figura 1 – *C. fairchildiana* R. A. Howard. A) Árvore. B) Aspecto das flores atrovioláceas. C) Sementes (material de estudo).

Clitoria fairchildiana é uma espécie arbórea de médio a grande porte medindo de 6 a 12 m de altura. Possui copa frondosa e inflorescência em cachos composta por flores atrovioláceas e fruto deiscente, ou seja, depois de certo tempo, abre-se para liberação das sementes (Figura 1). Seu tronco é curto e revestido por casca fina e lisa.

Segundo Scalon *et al.* (2006), a madeira desta árvore é utilizada na construção civil como divisórias e forros como também, na produção de brinquedos, apesar de apresentar baixa durabilidade em condições naturais.

É bastante utilizada na recuperação de áreas degradadas devido seu rápido crescimento e considerável resistência em áreas adversas (BONINI e ALVES, 2011).

Devido esta importante característica da *C. fairchildiana* tanto para a arborização urbana e rural como também na recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 1992), a maioria dos estudos envolvendo esta espécie focam investigações do efeito da germinação sob condições de sombreamento (SCALON *et al.*; 2006), estresse hídrico (SILVA e CARVALHO, 2008), ataque de lagartas *Urbanus acawoios* (TREVISAN *et al.*; 2004) estudos estes que buscam aprimorar a forma de cultivo do vegetal ou evitar possíveis infestações indesejáveis.

Outros estudos com algumas substâncias extraídas da *C. fairchildiana* foram desenvolvidos. Isolamento de rotenóides de suas sementes (MATHIAS, MORS e PARENTE, 1998) e das raízes (SILVA, BERNARDO E PARENTE, 1998) onde já era relatado a escassez de trabalhos de análise fitoquímica da espécie quando comparado a quantidade de estudos de outra espécie do gênero. Silva e Parente (2002) avaliaram o potencial anti-inflamatório de cinco rotenóides extraídos das raízes de *C. fairchildiana* sendo este efeito dependente da estrutura anelar destes compostos.

Barahona *et al.*, (2006) isolaram taninos condensados extraídos deste vegetal e analisaram quanto a seu efeito sobre enzimas fibrolíticas mostrando uma relativa capacidade de redução da atividade de algumas das enzimas testadas.

Em estudo desenvolvido por Annegowda *et al.* (2011), extratos das sementes e das vagens de *C. fairchildiana* indicou altas concentrações de antioxidantes naturais. Os autores a caracteriza como sendo um vegetal sub-utilizado e devido esta ação antioxidante, sugere sua inclusão como aditivos alimentares ou até mesmo sua utilização na indústria farmacêutica.

Outra espécie deste gênero, *Clitoria ternatea*, mostra-se melhor caracterizada na literatura quanto a seus aspectos bioquímicos e biológicos. Foi purificada e caracterizada uma lectina das sementes de *C. ternatea* ligante de galactose e *N*-acetilgalactosamina capaz de aglutinar eritrócitos humanos tipo B (NAEEM, HAQUE e KHAN, 2007).

Diversas partes da *C. ternatea* apresentaram-se como sendo antiinflamatória, analgésica, antipirética e imunomoduladoras (MUKHERJEE *et al.*, 2008). Extrato metanólico desta espécie apresentou atuação no Sistema Nervoso Central exibindo efeito ansiolítico, anticonvulsivante, antidepressivo e anti-estresse, porém o princípio ativo ainda precisa ser isolado e esclarecido seu mecanismo de ação (JAIN *et al.*, 2003).

Rao *et al.* (2009) investigaram o potencial antioxidante do extrato aquoso das folhas de *C. ternatea* indicando a presença de compostos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Solanki e Jain (2010) em estudo desenvolvido com extratos etanólicos da semente e da raiz da *C. ternatea* mostraram efeito hepatoprotetor em ratos. Este efeito pode ser atribuído a propriedades antioxidantes e por promover diminuição da peroxidação lipídica. Outra investigação do potencial antioxidante de extratos de raízes e flores de *C. ternatea* indicou a presença de antioxidantes naturais presentes na espécie (PATIL e PATIL, 2011). Em 2012, Yuwa-Amornpitak, Koguchi e Teramot apresentaram em extratos de flores de *C. ternatea* a concentração de compostos fenólicos e o efeito antioxidante exercido por eles.

Extratos das folhas de *C. ternatea* foram analisados quanto a seu efeito sobre as bactérias *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris* e *Salmonella typhi* mostrando ter ação antibacteriana contra estes patógenos. (ANAND, DOSS e NANDAGOPALAN, 2011).

Chauhan *et al.* (2012) em artigo de revisão refere os efeitos já citados anteriormente exercidos por *C. ternatea* e acrescenta:

Nos últimos tempos, o foco em pesquisa de plantas tem aumentado em todo o mundo e grandes evidências vêm sendo coletadas mostrando um imenso potencial de plantas medicinais utilizadas em vários sistemas tradicionais. O uso de drogas à base de plantas e produtos químicos para a cura de várias doenças é tão antiga quanto à civilização humana.

2.2 Lectinas

2.2.1 Conceituando lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, que tem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversível e especificamente a carboidratos

simples ou complexos, sem causar alteração do ligante (LIS and SHARON, 1986; RUDIGER e GABIUS, 2001; LORIS, 2002).

O termo lectina é derivado do latim *legere* que significa selecionar ou escolher. Outros termos já foram utilizados como aglutininas, hemaglutininas e fitohemaglutininas (as extraídas de plantas). Estes termos tornaram-se inadequados a partir do momento em que o entendimento destas proteínas passou de observações macroscópicas de aglutinação de hemácias ao entendimento molecular de como estas proteínas atuam (ZANETTI, 2007).

2.2.2 Funções das lectinas vegetais x propriedades biológicas

É necessário entender que funções das lectinas e suas propriedades biológicas são pontos distintos e existe uma linha tênue diferindo estas duas ideias.

Desde o descobrimento das lectinas até os dias atuais, a função destas proteínas em vegetais não foram bem esclarecidas e comprovadas. Rudiger e Gabius (2001) relatam que lectinas homólogas podem apresentar funções, especificidade a açúcares, localização celular e período de síntese, diferentes.

As evidências obtidas a respeito do papel das lectinas na defesa de plantas indicam que pelo menos algumas dessas proteínas são importantes componentes dos sistemas de defesa contra insetos fitófagos e animais herbívoros e possivelmente contra microorganismos. Algumas lectinas podem estar envolvidas nos mecanismos de defesa ativos relacionado à sua afinidade por carboidratos (Peumans *et al.*, 1995).

A expressão da lectina de *Gastrodia elata* em células de raízes e tubérculos foi induzida fortemente pelo fungo *Trichoderma viride* indicando sua importância na defesa de plantas (SÁ *et al.*, 2009).

Com o avanço das pesquisas com lectinas observa-se que estas proteínas podem apresentar diferentes ações em organismos. Lectinas são valiosas ferramentas para o entendimento de glicoconjugados, histoquímica de células e tecidos e para a análise de alterações que ocorrem na superfície celular durante processos fisiológicos e até mesmo patológicos (SHARON e LIS, 2004).

As atividades biológicas apresentadas pelas lectinas ainda são pouco entendidas, mas acredita-se que ocorra por meio de alguma cascata de sinalização celular que é iniciada através da ligação lectina-carboidrato.

Diversas propriedades biológicas já foram descritas para as lectinas. Algumas lectinas já foram descritas apresentando ação antitumoral, antiviral, analgésica, anti e pró-inflamatórias, bem como antibacteriana e antifúngica.

Quando se trata do estudo de lectinas com ação antitumoral, deve-se considerar que as células malignas diferem das células normais na distribuição de hidratos de carbono da superfície celular e muitas lectinas apresentam afinidade por eles (BROOKS *et al.*, 2001, KANNAN *et al.*, 2003). Inbar e Sachs (1973) purificaram lectinas as quais reconheciam seletivamente células malignas. Uma segunda lectina isolada de *Viscum album* induziu apoptose de células tumorais (KIM *et al.*, 2000). A lectina de *Phaseolus vulgaris* apresentou efeito antitumoral impedindo a proliferação de células do câncer de mama (LAM e NG, 2010).

A superfície de muitos vírus, inclusive de retrovírus tais como do vírus da imunodeficiência humana (HIV) é recoberta por glicoproteínas (JI *et al.*, 2006). Uma importante descoberta foi a lectina de *Musa acuminata* (BanLec) que é capaz de inibir a replicação do HIV-1 (SWANSON *et al.*, 2010). Acredita-se que a ação da lectina sobre o ataque do vírus se deve a capacidade da lectina de interagir com resíduos de manose contidos na superfície glicoproteica do mesmo. Esta interação promove perturbação das proteínas do envelope viral dificultando sua adesão à célula hospedeira (BALZARINI, 2006). Outras lectinas com tal propriedade são a lectina isolada de *Myrianthus holstii* (CHARAN *et al.*, 2000) e a lectina de *Urtica dioica* (BALZARINI *et al.*, 1992).

2.2.2.1 Atividade antinociceptiva

A dor é uma forma de defesa do organismo que serve como alerta da existência de algum comprometimento da integridade física ou funcional do indivíduo, ativando mecanismos para que o agravante seja prevenido ou limitado (TEIXEIRA, 1990).

A IASP, Associação Internacional para o Estudo da Dor definiu a dor como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”.

Existem três tipos de dor. Dor nociceptiva, ou seja, ligada à receptores (nociceptores); dor neurogênica que ocorre por uma lesão na via de transmissão da dor e dor psicogênica que é de origem emocional.

Nocicepção é derivada de duas palavras do latim, *nocere* e *capêre* que significam respectivamente, nocivo e captar, ou seja, captação do que é nocivo. É o conjunto das percepções de dor que somos capazes de distinguir.

Na dor nociceptiva há três tipos de estímulos que geram potenciais de ação nos axônios dos nervos. Estímulos mecânicos ou térmicos que ativam diretamente as terminações nervosas e estímulos químicos liberados na área da terminação nervosa. Os receptores sensíveis a alterações químicas do meio ou à ligação de um neurotransmissor é denominado quimioceptor (TEIXEIRA, 1990).

A ativação dos nociceptores promove a liberação de mediadores químicos locais como, bradicinina, histamina, serotonina, citocinas, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico, somatostatina, acetilcolina, entre outros. Estes mediadores interagem com nociceptores específicos levando à propagação do sinal por alteração na permeabilidade da membrana da fibra nervosa gerando então, potencial de ação (JULIUS et al., 2001; GRIFFIS et al., 2006).

No entanto, quando a dor passa a se repetir ou se prolongar por longo período de tempo, deixa de apresentar vantagens biológicas e passa a causar sofrimento (MELZACK et al., 1999).

Atualmente, pesquisas estão sendo desenvolvidas com o intuito de elucidar novos fármacos que possam reduzir ou eliminar o processo doloroso, compreendendo-se os mecanismos envolvidos na antinocicepção (VITOR et al., 2008).

Algumas lectinas já foram estudadas quanto a seu potencial antinociceptivo. A lectina de *Hypnea cervicornis* apresentou efeito antinociceptivo em modelos de contorções abdominais por indução de ácido acético e este efeito foi revertido pela mucina, seu carboidrato específico, concluindo, portanto que a ação antinociceptiva possa estar relacionada (BITENCOURT et al., 2008).

Lectinas da subtribo Diocleinae apresentaram efeito antinociceptivo reduzindo contorções abdominais quando administradas via oral (HOLANDA et al., 2009).

Lectina de *Amansia multifida* promoveu ação antinociceptiva dose-dependente por redução do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, apresentando este efeito tanto por administração intraperitoneal quanto por via oral. Esta lectina também apresentou efeito central por produzir respostas inibitórias ao estímulo térmico (NEVES et al., 2007).

2.2.2.2 Atividade antiinflamatória

A inflamação é uma resposta natural do organismo contra uma lesão ou infecção do tecido. Sabe-se que durante o processo inflamatório várias etapas estão associadas à ação de substâncias endógenas que modificam fisiológica e bioquimicamente a estrutura do local afetado. Essas substâncias químicas, denominadas mediadores, são inicialmente liberadas no local da injúria como uma reação de alarme, onde macrófagos parecem ter um papel crucial (FERREIRA, 1980). Os macrófagos sinalizam a presença de corpo estranho ou injúria através da liberação de mediadores clássicos da inflamação e de citocinas, estes por sua vez, recrutam leucócito, macrófagos, eosinófilos, linfócitos, células estas que atuam amplificando a resposta inflamatória, caracterizada pelos cinco sinais clássicos: calor, rubor, edema, dor e disfunção (FERREIRA, 1993).

Um sequencia de eventos acompanha esta resposta inflamatória como vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo local e da permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos, ação de proteases, espécies reativas de oxigênio, necrose e apoptose, além da liberação de inúmeros mediadores pró-inflamatórios (HUERRE, GOUNON, 1996).

A dor surge então, como resultado tanto do dano inicial que deu início ao processo inflamatório quanto da própria resposta inflamatória promovida pelos mediadores liberados ou até mesmo pela compressão dos nervos sensoriais ocasionada pelo edema no local.

Muitas lectinas são investigadas quanto seu efeito sobre o processo inflamatório e seu mecanismo de ação frente a este processo. A maioria das lectinas apresentam atividades pró-inflamatórias, mas algumas atuam como anti-inflamatória (BITENCOURT *et al.*, 2008).

Existem lectinas que podem atuar tanto como anti-inflamatória como pró-inflamatória, sendo este fato dependente da via de administração utilizada. Investigação desenvolvida por Mota *et al.* (2006) identificou uma lectina de *Araucaria angustifolia* com ação pró e anti-inflamatória. A lectina estudada exerceu ação antiinflamatória reduzindo edema de pata produzido por dextrana, um agente flogístico, quando administrada via intravenosa. A mesma lectina, quando administrada via subcutânea, na mesma dose que exerce efeito antiinflamatório, apresenta-se edematogênica.

Lectina de *Luetzelburgia auriculata* são galactose-específica e apresentam efeitos antiinflamatórios, que age inibindo o rolamento de leucócitos e modulando a liberação de histamina e PGE2 (ALENCAR *et al.*, 2010). Lectinas de *Canavalia gladiata* exibiram efeitos antiinflamatórios e analgésicos (NUNES *et al.*, 2009).

Diversas outras lectinas apresentaram efeitos como de ativação de linfócitos e atividade antidepressiva exercido por lectinas de *Canavalia brasiliensis* (BARBOSA *et al.*, 2001; BARAUNA *et al.*, 2006), liberação de óxido nítrico e efeito vasodilatador por *Canavalia maritima* (GADELHA *et al.*, 2005; ASSREUY *et al.*, 2009).

2.2.2.3 Atividade antifúngica

Fungos são seres eucarióticos, com um só núcleo, como as leveduras, ou multinucleados, como se observa entre os fungos filamentosos ou bolores. Seu citoplasma contém mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. A presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas e a sua capacidade de depositar glicogênio os assemelham às células animais (MURRAY; ROSENTHAL; PFAUER, 2006).

Os componentes principais da parede celular são hexoses e hexoaminas, que formam mananas, ducanas e galactanas. Alguns fungos têm parede rica em quitina (*N*-acetil glicosamina), outros possuem complexos polissacarídeos e proteínas, com predominância de cisteína.

Para Fukuda *et al.* (2009):

A parede celular é uma estrutura rígida, essencial para a sobrevivência dos fungos, e o conhecimento de sua composição é útil para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas. Neste contexto, os polissacarídeos estão entre os seus principais componentes que têm sido alvos de intensa investigação científica.

Esta característica da parede celular dos fungos tornam estes seres interessantes para investigações de propriedades biológicas de lectinas.

No entanto, apesar de inúmeras lectinas terem sido estudadas, apenas algumas apresentam ação antifúngica. Apenas as quimerolectinas quitinásicas pode exercer efeito fungicida, efeito este desenvolvido pelo domínio catalítico da molécula.

O efeito antifúngico de lectinas acredita-se que seja desenvolvido de forma indireta por efeitos gerados pela interação lectina- fungo (VAN PARIJS *et al.*, 1991). A

lectina de *Capsicum annuum* exibiu uma acentuada inibição da germinação dos esporos dos fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium graminearum* (KUKU *et al.*, 2009). A lectina das sementes de *Archidendron jiringa* demonstrou inibir o desenvolvimento dos fungos patogênicos *E. turcicum*, *F. oxysporum*, *C. cassiicola* e *C. albicans*, e das bactérias *Stafilococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (CHARUNGCHITRAK *et al.*, 2011). Estudo desenvolvido por Gosh (2009) mostra uma lectina de *Withania somnifera* apresentando atividade antifúngica contra fitopatógenos.

A lectina de *Aplysia kurodai* foi capaz de inibir o crescimento do micélio de *Curvularia lunata* (KAWSAR *et al.*, 2010)

2.2.2.4 Atividade antibacteriana

As bactérias são organismos unicelulares, sem envoltório nuclear, que se reproduzem assexuadamente. Na maioria das espécies, a proteção da célula é feita por uma camada extremamente resistente, a parede celular, havendo imediatamente abaixo uma membrana citoplasmática que delimita um único compartimento contendo DNA, RNA, proteínas e moléculas pequenas. Esta parede celular, nas bactérias Gram-positivas são formadas por uma espessa camada de proteoglicanos, ao passo que, nas Gram-negativas apresentam uma fina camada de proteoglicanos e uma membrana externa (MURRAY; ROSENTHAL; PFAUER, 2006).

Pode haver interação de glicoconjugados e de proteínas reconhecedoras de carboidratos com a superfície de bactérias, como também, esta parede, pode impedir a penetração destes compostos no citoplasma. Lectinas já foram utilizadas para analisar carboidratos presentes em parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DOYLE, 1994). Munoz-Crego *et al.* (1999) relataram que a caracterização estrutural das lectinas vegetais revelou a presença de sítios específicos de ligação que reagem com carboidratos expostos na superfície de microrganismos, possibilitando a identificação de bactérias patogênicas baseando-se na aglutinação seletiva.

Esta capacidade das lectinas de interagirem com carboidratos presentes na superfície de bactérias podem promover a estas proteínas uma ação antibacteriana que Gaidamashvili e Standen (2002) acreditam ser por impedimento da mobilidade e do crescimento bacteriano, isto pode acontecer em decorrência da alteração da estrutura e permeabilidade da membrana. Islam *et al.*, (2009) acreditam que este efeito

antibacteriano possa ser por impedimento da ligação da bactéria ao hospedeiro realizado pela lectina.

Lectinas com potencial antibacteriano já foram descritas na literatura. A lectina do veneno da serpente *Bothrops leucuris* é capaz de inibir, com baixas concentrações, o crescimento das bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus fecalis*, e a bactéria saprófita *Bacillus subtilis* (NUNES *et al.*, 2011). A lectina de *Archidendron jiringa* é capaz de impedir o crescimento de *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (CHARUNGCHITRAK *et al.*, 2011). Uma lectina galactose ligante foi isolada de *Clarias indianos* a qual promoveu aglutinação das cepas de *E. coli*, *P. aeruginosas* e *Klebsiella* (DUTTA *et al.*, 2005).

Tomando como base o comportamento dessas substâncias, pode-se propor aplicações futuras para essas proteínas, como a vetorização de fármacos a sítios específicos do corpo (BARREIRO, 2007) e a associação de lectinas com lipossomas (ANDRADE *et al.*, 2004) que induzem uma liberação continuada da lectina no organismo, gerando uma constante presença do seu benefício terapêutico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar uma lectina presente em sementes de *Clitoria fairchildiana*, avaliar o potencial farmacológico (antinociceptivo, pró e antiinflamatório, hemolítico, antibacteriano e antifúngico) da lectina isolada.

3.2 Objetivos Específicos

- Coletar periodicamente sementes de *C. fairchildiana* para testes de atividade hemaglutinante e posteriores etapas de purificação;
- realizar análise da composição centesimal da semente de *C. fairchildiana*;
- isolar uma lectina por método cromatográfico com auxílio de técnicas de fracionamento protéico;
- determinar o açúcar específico da lectina através de teste de inibição da atividade hemaglutinante utilizando diferentes açúcares e glicoproteínas;
- avaliar a homogeneidade da lectina isolada através de eletroforese em gel de poliacrilamida;
- identificar glicanos
- analisar físico-quimicamente a lectina estudada;
- verificar a atividade antinociceptiva através do modelo de contorções abdominais e teste da formalina em camundongos;
- verificar as atividades pró e antiinflamatória no modelo de edema de pata e peritonite em ratos;
- avaliar potencial citotóxico da lectina através de testes de atividade hemolítica e fragilidade osmótica;
- analisar efeito pró e antioxidante da lectina em estudo;
- verificar efeito antibacteriano e antifúngico da lectina isolada.

4 METODOLOGIA

4.1 Composição centesimal das sementes de *C. fairchildiana*

4.1.1 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade das sementes de *C. fairchildiana* foi analisado de acordo com AOAC (1990) onde, cápsulas contendo 2 g da farinha das sementes foram submetidas à secagem em estufa a 105 °C por 24 h. Depois de transcorrido o tempo, as amostras foram levadas ao dessecador por 1 h e posteriormente pesadas. Os valores de peso encontrados foram aplicados na equação a seguir:

$$\text{Umidade (\%)} = N \times 100 / P$$

Onde:

N = perda de peso: cápsula + amostra – peso da cápsula = X;

Peso da amostra inicial – X => N.

P = Peso da amostra em gramas

4.1.2 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas das sementes de *C. fairchildiana* foi determinado segundo AOAC (2000). Cadinhos de porcelana foram pesados e adicionou-se 2 g da farinha das sementes. Os cadinhos foram levados à manta aquecedora para incineração. Após o processo, levados ao forno mufla a 550 °C até a formação das cinzas. Pesou-se o cadinho contendo as cinzas e os valores de peso encontrados foram aplicados na equação a seguir:

$$\text{Cinzas (\%)} = A \times 100 / P$$

Onde:

A = peso das cinzas = (peso do cadinho + cinzas) – (peso do cadinho)

P = peso da amostra (g)

4.1.3 Determinação de nitrogênio total

Para análise do teor de proteína presente nas sementes de *C. fairchildiana* foi utilizado o método de Kjeldahl (AOAC, 2000) determinando-se o teor de nitrogênio total presente na amostra. A 0,5 g da farinha das sementes adicionou-se, 1 g de mistura catalítica: óxido de selênio, sulfato de cobre, sulfato de potássio (1:10:100) e 7 mL de ácido sulfúrico concentrado. As amostras foram digeridas a temperatura de 350 °C até atingir coloração verde. Posteriormente, realizou-se a destilação da amostra com NaOH a 40 %, fenolftaleína 1 % e ácido bórico. Como etapa final, as amostras foram tituladas com HCl concentrado. Para conversão do teor de nitrogênio total em proteínas utilizou-se o fator de conversão de 6,25. O percentual de proteínas presentes na amostra foi calculado aplicando-se a equação a seguir:

$$\%PTN = V_{\text{titulação}} \times F_{\text{correção do HCl}} \times F_{\text{conversão da PTN}} \times 0,0014 \times 100 / \text{peso da amostra}$$

4.1.4 Determinação do teor de lipídeos

Para determinação do teor de lipídeos das sementes de *C. fairchildiana* utilizou-se a farinha das sementes desidratadas. Pesou-se as amostras em cartuchos de celulose que foram acoplados ao extrator de Soxhlet onde sofreu extração de lipídeos por 4h a 6h sob calor e solvente orgânico (hexano). Após extração total dos lipídeos os balões contendo os lipídeos extraídos das sementes foram levados à estufa a 105 °C por 1 h e posteriormente ao dessecador e sequencialmente pesados (AOAC, 2000). Os cálculos para percentual do teor de lipídeos presentes na amostra foram realizados a partir da equação a seguir para análise em base seca:

$$\text{LIP (\%)} = (\text{peso do balão} + \text{lipídeos}) - (\text{peso do balão}) \times 100 / \text{peso da amostra seca}$$

4.1.5 Carboidratos

O percentual de carboidratos presentes nas sementes de *C. fairchildiana* foi estimado no cálculo por diferença conforme O percentual de carboidrato nas amostras

foi obtido por diferença [%CHO = 100 - (%água + %PT + %LT + %CZ)], conforme descrito por Brasil/ANVISA (2001).

4.2 Purificação da lectina de *C. fairchildiana*

4.2.1 Coleta e preparo da amostra

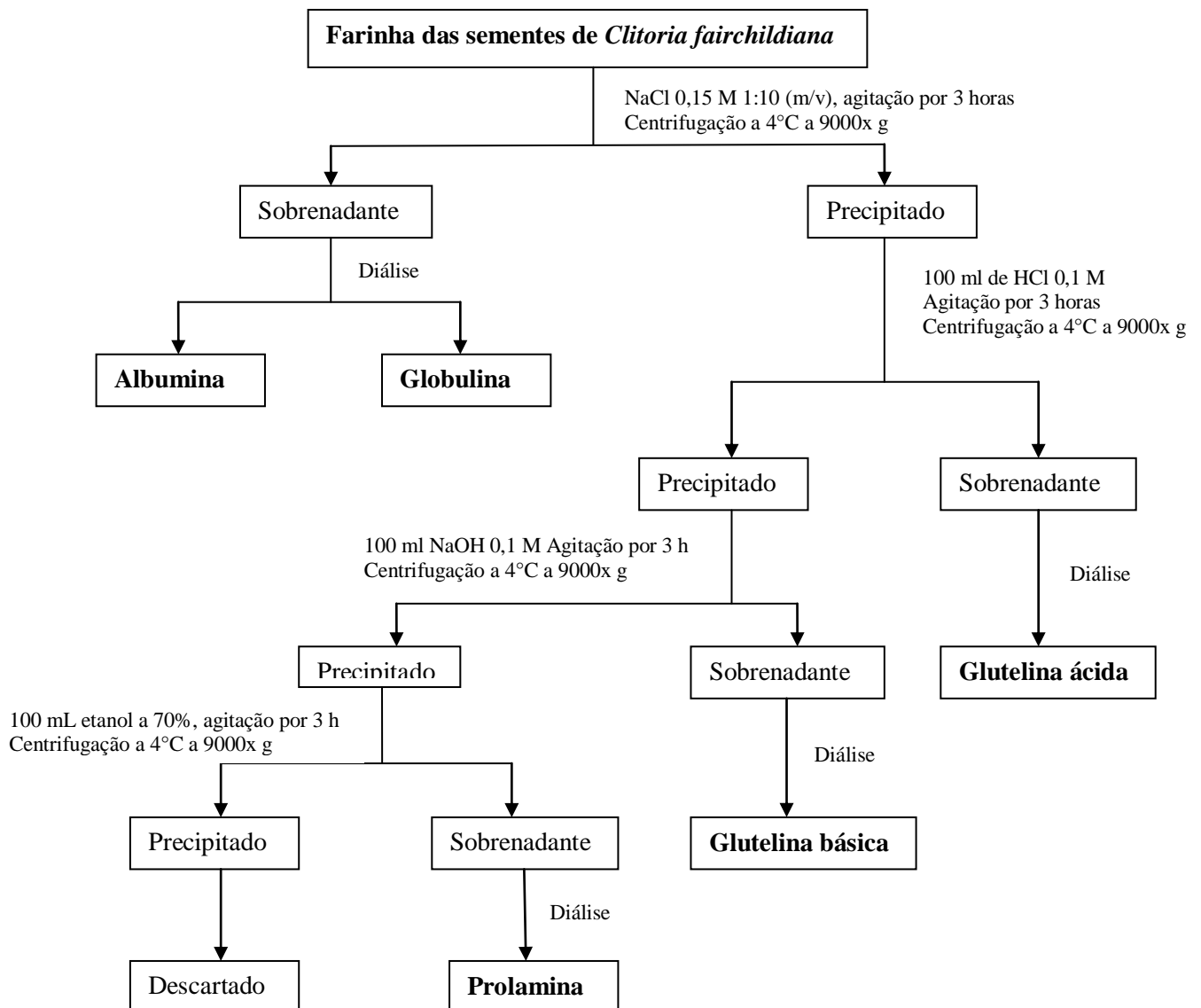
As sementes de *Clitoria fairchildiana* foram coletadas no Campus do Pici no Estado do Ceará, Brasil. Foram trituradas em moinho elétrico tipo Willey e a farinha fina obtida foi então delipidada por ação de solvente orgânico (hexano). A farinha delipidada foi armazenada em recipientes de vidro hermeticamente fechados e utilizadas para as análises posteriores.

4.2.2 Eritrócitos

Os eritrócitos de coelho foram obtidos de coelhos doados pela Universidade Federal da Paraíba e os eritrócitos humanos foram obtidos de doadores saudáveis a partir do Centro de Hematologia da Paraíba.

4.2.3 Fracionamento protéico

A farinha delipidada foi submetida à extração por 3 horas em solução de NaCl 0,15 M (1:10) à temperatura de 25 °C. A suspensão obtida foi centrifugada a 9.000 x g a 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi dialisado contra água para obtenção das frações albumina e globulina e ao precipitado foi adicionado 100 mL de HCl 0,1 M e submetido a nova extração por 2 horas. A suspensão obtida foi centrifugada a 9.000x g a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi dialisado contra água para obtenção da fração glutelina ácida e ao precipitado foi adicionado 100 mL de NaOH 0,1 M e submetido a nova extração por 2 horas. Após centrifugação, o sobrenadante foi dialisado contra água para obtenção da fração glutelina básica e ao precipitado foram adicionado 100 mL de etanol a 70%. Após centrifugação o sobrenadante foi dialisado contra água para obtenção da fração prolamina. O precipitado foi descartado. Todas as frações, depois de dialisadas, foram liofilizadas e destinadas para análises subsequentes (Esquema 1).



Esquema 1 - Fracionamento por solubilidade proteica das sementes de *Clitoria fairchildiana*

4.2.4 *Ensaio de atividade hemaglutinante*

A atividade hemaglutinante das diferentes frações protéicas foi analisada por meio de diluições duplo-seriadas em NaCl 0,15 M. A cada 100 μ L de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias de coelho e do sistema ABO a 3% em NaCl 0,15 M, nativas e tratadas enzimaticamente (de forma prévia) com soluções à 1% de tripsina, papaína e bromelaina. Os tubos foram incubados em estufa a 37 °C durante 30 minutos em seguida deixados em repouso à temperatura de 25 °C por 30 minutos. A menor concentração protéica que apresentou hemaglutinação visível é considerada a concentração correspondente a uma unidade de hemaglutinação (UH), sendo o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH/mL).

4.2.5 *Determinação de proteínas solúveis*

A quantificação de proteínas solúveis foi baseada no método descrito por Bradford (1976) usando albumina sérica bovina como proteína padrão. A cada 100 μ L de amostra foram adicionados 2,5 mL do reagente de BRADFORD. Após a agitação e repouso por 10 minutos realizou-se leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

4.2.6 *Purificação da lectina de C. fairchildiana (CFAL)*

A fração protéica glutelina ácida (10mg/mL) foi aplicada à coluna de troca iônica Dietilaminoetil-Sephacel (DEAE-Sephacel) previamente equilibrada com Tris-HCl 0,025 M pH 7,6. O material não retido (PI) foi eluído com o tampão de equilíbrio e o material retido (PII), contendo a lectina, foi eluído em *step wise* com NaCl 0,5 M em Tris-HCl 0,025 M pH 7,6. Os picos (I e II) foram posteriormente analisados quanto a presença da lectina.

4.2.7 *Especificidade da lectina a açúcares e glicoproteínas*

A especificidade da lectina a carboidratos e glicoproteínas foi determinada comparando-se a atividade inibitória de açúcares e glicoproteínas sobre a hemaglutinação. A cada 50 μ L de uma solução de NaCl 0,15 M, foi adicionado a

solução do açúcar ou glicoproteína e diluído serialmente. À mistura foi adicionado 50 μL da amostra lectínica e deixada em estufa a 37 °C por 30 minutos, seguidos de outros 30 minutos a temperatura de 25°C. Em seguida, foram adicionados 100 μL de uma suspensão de hemácias a 3%, e a mistura deixada em estufa a 37°C por 30 minutos, seguidos de outros 30 minutos a temperatura de 25°C. A concentração inicial de carboidratos e glicoproteínas foi de 0,1 M e 5mg/mL, respectivamente. Os carboidratos utilizados foram D-glicose, D-galactose, D-manose, N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-galactosamina, L-fucose, lactose, α -metil-manosídeo e as glicoproteínas utilizadas foram fucoídano, carragenina, mucina e fetuína. Os resultados foram expressos como a concentração mínima de açúcar ou glicoproteína capaz de inibir a hemaglutinação (RAMOS et al, 1999).

4.2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol (SDS-PAGE)

A SDS-PAGE foi realizada segundo método descrito por LAEMMLI (1970). O gel de aplicação foi preparado na concentração de 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 1%, enquanto que o gel de separação apresentava 12,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8 e SDS a 1%. As amostras (Glutelina ácida, Pico I e Pico II DEAE-Sephacel) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,625 M, pH 6,7, contendo SDS a 2%, glicerol a 10%, β -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,02% e foram aquecidas em estufa a 100°C durante 10 minutos, posteriormente centrifugadas por 5 minutos. O procedimento ocorreu sob amperagem constante (25 mA) e ao final da corrida, o gel foi fixado em TCA 12,5% por uma hora, sendo então corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,005%. A remoção do excesso de corante foi realizada com o auxílio de uma solução descorante de metanol, ácido acético e água (1:3,5:8, v/v/v). Como marcadores protéicos utilizou-se a miosina (212 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina da soja (21,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

4.2.9 Identificação de glicoproteínas

4.2.9.1 Teste de Molisch

A presença de carboidrato na amostra foi determinada pelo Teste de Molisch. A CFAL foi diluída em NaCl 0,15 M (2 mg/mL), a cada 2 mL da solução, adicionou-se o Reativo de Molisch (alfa-naftol) e H₂SO₄ concentrado. O surgimento de um anel de coloração lilás estável indica a presença de açúcares na amostra. Como controle negativo foi utilizado apenas solução salina 0,15 M.

4.2.9.2 Teste de Schiff

Foi realizado o teste de Schiff segundo método descrito por Kapitany e Zabrowski (1973) para verificar a presença de moléculas de açúcar na amostra.

Após eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas presentes no gel foram fixadas por 30 minutos em TCA 12%. Em seguida, o gel foi lavado com uma solução de ácido periódico 1% e ácido acético 3% por 1 hora, no escuro. Após 12 horas de lavagem do gel com água destilada, o gel foi corado com reagente de Schiff por 50 minutos no escuro. As bandas foram então reveladas por uma solução contendo bissulfito de sódio 0,5% por 12 horas e posterior lavagem com água destilada por 12 horas. O gel foi conservado em ácido acético 5%. Utilizou-se fetuína como glicoproteína padrão.

4.2.9.3 Determinação de carboidratos solúveis

A análise quantitativa da presença de carboidratos na amostra lectínica foi determinada pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois *et al.*, (1956). A CFAL foi diluída em NaCl 0,15 M (2 mg/mL). À 500 µL desta solução foram adicionados 0,5 mL de fenol bidestilado 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. Foi realizada leitura em espectrofotômetro à absorvância de 490 nm. Utilizou-se glicose (400 µg/mL) como padrão.

4.3 Caracterização físico-química da CFAL

4.3.1 Efeito do EDTA e de cátions divalentes

A dependência de cátions divalentes sobre a atividade da lectina, especificamente Ca^{+2} e Mn^{+2} , foi determinada pela atividade hemaglutinante, por dupla diluição serial, usando EDTA como agente quelante, conforme Pajic *et al.* (2002).

A lectina foi diluída em EDTA 250 mM em Tris-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,5 M pH 7,6 na concentração de 2 mg/mL e incubada por 30 minutos. Após esse período, foi adicionado cloreto de cálcio, sulfato de manganês, na concentração final de 40 mM, e incubado por 30 minutos. As amostras assim tratadas foram diluídas serialmente em Tris-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,5 M pH 7,6, quando então os eritrócitos nativos de coelho a 3% foram acrescentados.

Paralelamente, a atividade da lectina foi determinada após incubar com EDTA 250mM, e após incubar com os cátions divalentes sem tratamento prévio com EDTA. Como controle foi utilizado apenas lectina (2 mg/mL) em Tris-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,5 M pH 7,6 (ZANETTI, 2007).

4.3.2 Efeito do agente desnaturante uréia

A lectina (2 mg/mL) foi diluída em uréia 8 mM (diluído em Tris-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,5 M pH 7,6) e incubados por 30 min e *overnight* a 25 °C. Depois de transcorrido o tempo, realizou-se atividade hemaglutinante com sangue de coelho nativo a 3%. Como controle foi utilizado apenas lectina (2 mg/mL) em Tris-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,5 M pH 7,6 (COELHO, 2002).

4.3.3 Ação do agente redutor β -mercaptoetanol

A lectina (2mg/mL) foi incubada 30 min em Tris-HCl 0,1M contendo NaCl 0,5 M pH 7,6 contendo β -mercaptoetanol a 10 mM. Após incubar a temperatura de 25°C, a atividade hemaglutinante foi avaliada como descrito no item 4.2.4. Como controle foi utilizado apenas lectina (2 mg/mL) em Tris-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,5 M pH 7,6 (ZANETTI, 2007).

4.3.4 Ação do agente oxidante metaperiodato de sódio

Uma alíquota da lectina (2 mg/mL) foi diluída em metaperiodato de sódio (10 mM), diluído em acetato de sódio 10 mM pH 5,5 e subsequentemente incubado a temperatura ambiente ao abrigo da luz por 10 minutos. A solução foi dialisada contra Tris-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,5 M, pH 7,6 por 12 horas. A atividade hemaglutinante foi testada conforme descrito no item 4.2.4 para verificação da integridade da lectina.

4.3.5 Efeito da variação de pH

Uma alíquota da lectina (2 mg/mL) foi diluída em Tris-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,5 M, pH 7,6 a esta solução foram adicionadas alíquotas de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M. A cada variação de um ponto na faixa de pH eram coletadas amostras para realização da atividade hemaglutinante segundo descrito no item 4.2.4 para verificação da integridade da lectina.

4.3.6 Resistência da CFAL à hidrólise enzimática

A CFAL (1 mg/mL) foi colocada em contato com 100 µL da solução enzimática (500 µg/mL de NaCl 0,15 M) e incubou-se por 30 min à 37 °C. Depois de transcorrido o tempo de incubação testou-se atividade hemaglutinante conforme descrito no item 4.2.4 para verificar a integridade da lectina frente a enzimas proteolíticas. Utilizou-se para o teste as proteases tripsina, papaína e bromelaína. NaCl 0,15 M foi utilizado como controle negativo.

4.3.7 Termoestabilidade

A CFAL (2 mg/mL) diluída em Tris-HCl 0,1M pH 7,6 com NaCl 0,5M foi levada ao termociclador, programado para realizar variações de temperatura de 40°C a 100°C, aumentando em 10°C a cada 10 min. Foram coletadas alíquotas e analisada atividade hemaglutinante conforme descrito no item 4.2.4. Após atingir a temperatura de 100°C as alíquotas foram coletadas com 10, 20 e 30 minutos de aquecimento.

4.3.8 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Os experimentos de Espalhamento Dinâmico de Luz foram realizados no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas-SP, Brasil.

Os experimentos de DLS foram realizados utilizando uma concentração protéica de 2 mg/mL em cinco diferentes concentrações salinas (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) utilizando-se o sistema de DLS (DynaPro[®] – *Molecular Sizing Instruments, Protein Solutions, Lakewood, NJ, USA*). Os resultados foram analisados com o programa Dynamics V6. As amostras foram solubilizadas em tampão fosfato salina (PBS) pH 7,5, centrifugadas por pelo menos 30 minutos e, em seguida, injetadas (80 µL) cuidadosamente dentro de uma cubeta de quartzo evitando a formação de bolhas de ar. Cada amostra foi medida 100 vezes.

4.4 Atividades biológicas da CFAL

4.4.1 Modelos de nocicepção em camundongos

4.4.1.1 Teste de contorções abdominais

A metodologia utilizada seguiu o modelo proposto por VANDER-WENDE & MARGOLIN (1956) para ratos e modificada por KOSTER e cols. (1959) para camundongos. Os animais receberam ácido acético (0,8%; v/v) por via intraperitoneal obedecendo a relação 0,1 mL/10g de peso corporal. Após 10 minutos da indução por ácido acético iniciou-se a contagem do número de contorções abdominais que foi realizada durante 20 minutos.

Para avaliação do efeito antinociceptivo da CFAL, os camundongos foram tratados com esta lectina nas doses de 0,1; 1,0 e 10 mg/Kg em solução salina estéril (NaCl 0,9% m/v) por via intravenosa (i.v.), 30 minutos antes do ácido acético.

4.4.1.2 Teste da formalina

O teste da formalina foi baseado no método descrito por Hunskaar e Hole (1987). Administrou-se 20 μL de formalina 1,5% (v/v em água destilada) injetados por via subcutânea (s.c.) na superfície dorsal da pata posterior direita dos ratos. Imediatamente após a formalina, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação de vidro com chão transparente, sob a qual um espelho foi montado num ângulo de 45^o-C para permitir a observação clara das patas dos animais. O tempo (em segundos) gasto pelos animais para lambe as patas tratadas foi registada durante os 5 min antes da administração da formalina (primeira fase, o que corresponde a estimulação química direta de nociceptores), e de 15 a 30 min (fase 2, envolvendo a liberação de mediadores inflamatórios). Os animais receberam CFAL (10 mg / kg, iv) 30 min antes da formalina. O grupo controle recebeu solução salina estéril (0,1 mL, i.v.) 30 min antes da formalina.

4.4.2 Modelos de inflamação em ratos

4.4.2.1 Edema de pata

O edema foi induzido pela administração subcutânea intraplantar de 0,1 mL do agente inflamatório carragenina (300 μg /pata). O deslocamento de volume foi mensurado por um hidropletismômetro (PanLab, Barcelona-Spain) imediatamente antes do estímulo (tempo zero) e após o estímulo em intervalos de tempo de 1, 2 e 5 h. O grupo controle recebeu salina estéril (s.c.) em vez de carragenina. A lectina (0,015; 0,15 e 1,5 mg/kg e.v.) foi administrada 30 minutos antes da aplicação do agente flogístico. Os resultados foram expressos como o aumento do volume da pata (mL), calculada por subtração do volume basal, medido no tempo zero. As áreas sob as curvas (ASC) foram calculadas utilizando-se o método do trapézio e expressas em unidades arbitrárias (LANDUCCI et al., 1995) e comparadas com o grupo controle que recebeu mesmo volume de solução salina.

Para avaliação de alteração da permeabilidade vascular, os animais receberam azul de Evans (25 mg/kg; i.v.) 1 h antes do sacrifício por deslocamento cervical. As patas foram seccionadas, pesadas e incubadas em formamida durante 72 horas a 37^o

C. O corante extraído foi estimado em $A_{600\text{nm}}$ e expresso em μg azul de Evans/g de tecido (WILHELM, 1962).

4.4.2.2 Peritonite

A peritonite foi induzida por 1 mL de carragenina (300 μg) intraperitonealmente ou solução salina estéril (NaCl 0,9% m/v). Após 4 h os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal lavada com 10 mL de solução salina heparinizada (5 UI/mL). O fluido foi coletado para contagem total e diferencial de leucócitos. Os resultados foram expressos como número de células $\times 10^3/\text{mL}$ de fluido peritoneal (SOUZA, 1985). Os animais foram tratados com CFAL (1,5 mg / kg i.v.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9% m/v), 30 min antes dos estímulos.

4.4.3 Tratamento estatístico utilizado no estudo nociceptivo e inflamatório.

Os resultados foram apresentados como a média \pm S.E.M. de animais ($n = 6-8$) e as diferenças estatísticas foram detectadas pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de correção de Bonferroni, $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.4.4 Ensaio de citotoxicidade potencial da CFAL em eritrócitos humanos

Diferentes concentrações da CFAL (1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram adicionadas a 2 mL de uma suspensão 0,5% de eritrócitos humanos A, B e O. Foi utilizado NaCl 0,15 M como controle negativo e Triton X-100 como controle positivo. Após incubação por 1h a 25 °C sob agitação lenta de constante (100 rpm), a hemólise foi quantificada por espectrofotometria utilizando o comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et. al., 1997). Os resultados foram expressos como \pm o desvio padrão médio de três experimentos independentes.

4.4.5 Avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos frente à CFL

A avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos promovida pela CFAL foi baseada no método proposto por Dacie *et al.* (1984) com modificações. Foram utilizadas diferentes concentrações da CFAL (1, 2 e 3 mg/mL) em NaCl 0,15 M e

eritrócitos humanos (A, B, e O). 500 µL de eritrócitos foram adicionados a 500µL das diferentes concentrações de lectina e incubados por 1h a 37 °C. Após incubar as amostras foram centrifugadas e 25 µL do precipitado foi ressuspensão em 2,5 mL de NaCl em diferentes concentrações (0,1%; 0,3%; 0,5%; 0,7%; 0,9%) incubando-se por mais 1h a 25 °C. Depois de transcorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas e realizou-se leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Como controle negativo adicionou-se a 500 µL de eritrócitos, 500 µL de NaCl 0,15 M.

4.4.3 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante da CFAL em eritrócitos humanos

Para investigar o potencial oxidante da lectina estudada, foram utilizadas diferentes concentrações de CFAL (1, 10, 100 e 1000 µg/mL) diluídas em NaCl 0,15 M. Uma suspensão de eritrócitos humanos tipo O foi preparada a 30% em PBS pH 7,4 e suplementada com glicose 0,2%. A cada 2 mL da suspensão de eritrócitos foi adicionado Triton X-100 e as diferentes concentrações da lectina. Após um período de incubação de 1 h, sob agitação e constante (100 rpm), a 25 °C, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a porcentagem de metahemoglobina (metHb) em relação a hemoglobina (Hb) total foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm e 630 nm. Para investigar o potencial antioxidante, após incubação das diferentes concentrações de CFAL e hemoglobina por 1 h, foi adicionado um agente oxidante, a fenilhidrazina (PH) 1 mmol/L (SIGMA). As suspensões foram aeradas e mantidas sob agitação e constante (100 rpm) por mais 20 minutos a 25 °C. Decorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos, diluídas em tampão fosfato e a porcentagem de metHb em relação a Hb total foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm e 630 nm. As absorvâncias encontradas foram aplicadas à seguinte fórmula:

$$\text{mHb (\%Hb)} = \text{DO (630nm)} \times 100 / \text{DO (630nm)} + \text{DO (540nm)} \times 10$$

DO – Densidade óptica

Os valores de metHb entre 1,9 e 2,0 % foram considerados normais enquanto que valores acima de 4 % foram considerados elevados (CAMARGO *et al.*, 2007).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram expressos como média mais ou menos o erro padrão da média.

4.4.4 Atividade antibacteriana

4.4.4.1 Determinação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco

O estudo da atividade antibacteriana da CFAL por método de difusão em disco foi realizado segundo o método M2-A8 preconizado pelo NCCLS (2003). Três a cinco colônias bacterianas descritas a seguir, com igual perfil morfológico, foram selecionadas com auxílio de uma alça metálica. As colônias foram levadas a um tubo de ensaio estéril contendo NaCl (0,15 M). A turbidez do inóculo foi ajustada visualmente com o tubo 0,5 da escala de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL). O meio de cultura utilizado foi LB (Luria Bertani). Um *swab* estéril foi mergulhado no inóculo e posteriormente realizou-se o esfregaço sob toda a placa. Após secagem da superfície do ágar, discos de papel estéreis foram colocados sobre a placa. Uma concentração mãe da lectina foi preparada em Tris-HCl 0,1 M com NaCl 0,5 M pH 7,4 (20 mg/mL) e filtrada em filtro millipore (0,22 micras). A partir desta, foram preparadas outras duas concentrações de CFAL (10 mg/mL e 5 mg/mL). Adicionou-se 10 μ L de cada diluição sobre um disco de papel (Concentrações de 0,2 mg – 0,1 mg – 0,05 mg de lectina/disco). O tampão de diluição Tris-HCl 0,1 M com NaCl 0,5 M pH 7,6 foi usado como controle. As placas foram incubadas em estufa 37°C por aproximadamente 15 horas. A inibição do crescimento foi determinada macroscopicamente através da presença de halos de inibição.

4.4.7.2 Determinação da atividade antibacteriana pelo método de microdiluição

A determinação da atividade antibacteriana foi realizada segundo o método M7-A6 preconizado pelo NCCLS (2003). Três a cinco colônias das bactérias listadas na Tabela 1, com igual perfil morfológico, foram selecionadas com auxílio de uma alça metálica. As colônias foram levadas a um tubo de ensaio estéril contendo NaCl (0,15 M). A turbidez do inóculo foi ajustada visualmente com o tubo 0,5 da escala de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL). O inóculo foi diluído 1:10 (1 parte em 9 de NaCl 0,15

M), resultando em uma concentração de $1-2 \times 10^7$ UFC/mL. Foi utilizado o meio de cultura LB (Luria Bertani) preparado com 10g de extrato de levedura, 5g de triptona e 10g NaCl para 1 L de água destilada. Adicionou-se em cada poço da placa de microdiluição (fileira de 8 em duplicata) 100 μ L do caldo. A CFAL foi diluída no caldo LB (20 mg/mL) e a solução foi filtrada em filtro millipore (0,22 micras) . Nos primeiros tubos adicionou-se 100 μ L da CFAL e realizou-se diluição seriada (Concentrações de 1 mg – 0,5 mg – 0,25 mg – 0,125 mg – 0,625 mg – 0,03125 mg – 0,015625 mg de lectina/poço). Posteriormente adicionou-se 5 μ L do inóculo. As placas foram incubadas em estufa 37°C por aproximadamente 24 horas. A placa foi lida a 545 nm em Leitor de ELISA Readwell Plate ELISA Analyser – ROBONIK. Para o referido experimento utilizou-se as seguintes linhagens bacterianas *Bacillus subtilis* (CCT 0516), *Escherichia coli* (ATCC 2536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) (CCT - Coleção de Culturas Tropicais/ATCC – American Type Culture Collection).

4.4.5 Atividade antifúngica

4.4.8.1 Determinação da atividade antifúngica pelo método de difusão em disco

O teste de atividade antifúngica foi realizado segundo Bauer *et al.* (1966) citados por Silva (2004). Foram preparadas suspensões de $1-5 \times 10^4$ de esporos (tubo 0,5 da escala de Mac Farland) preparada em solução salina a 0,9% e contados em câmara de Neubauer com o uso de microscópio. Posteriormente, foram inoculados com *swab* em placas de Petri contendo SAB. Após o desenvolvimento do fungo, cada placa recebeu 5 discos de papel de filtro ($\varnothing=4$ mm) esterilizados (121°C, por 20 min), distribuídos a 2,5 cm do centro da placa de maneira equidistante e umedecido (40 μ L/disco de papel) com a fração protéica na concentração de 1, 2, 4, 6 e 8 mg/mL.

O desenvolvimento do parasita foi acompanhado e fotografado periodicamente. As placas foram incubadas a uma temperatura de 35 °C. Os resultados foram avaliados de acordo com a formação de halos de inibição do crescimento microbiano em milímetros em torno dos discos após 7 dias. Todo o procedimento de preparo do ensaio foi realizado em condições estéreis em capela de fluxo laminar. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados expressos em média aritmética. As linhagens

Microsporium canis (LM 62), *Microsporium gypseum* (LM 100), *Trichopyton mentagrophytes* (LM 08) e *Trichopyton rubrum* (ATCC 1683) utilizadas nos experimentos foram cedidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmaceuticas do CCS/UFPB.

4.4.8.2 Determinação da atividade antifúngica pelo método de microdiluição

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os fungos dermatófitos foi realizada de acordo com as normas do protocolo do Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínico (NCCLS) (M27-A2). Para este teste, foram utilizadas microplacas com 96 poços e suspensões com $1-5 \times 10^4$ esporos utilizando o caldo Sabouraud. Em cada poço foi colocado 100 μ L de caldo Sabourad, 100 μ L da CFAL (40 mg/mL) em diluição seriada + 100 μ L do inoculo.

Foram feitos dois controles positivos: o primeiro contendo meio de cultura e dermatófitos (100 μ L de caldo Sabouraud + 100 μ L do inoculo) e o segundo contendo meio de cultura, dermatófitos e diluente, sem as amostras testadas (100 μ L de caldo Sabouraud + 100 μ L do inoculo + 100 μ L de NaCl 0,15 M). As microplacas foram incubadas a temperatura de 35 °C e foram realizadas leituras após 24 horas por meio de visualização macroscópica.

4.4.8.3 Visualização de lectina de *C. fairchildiana* em esporos fúngicos

a) Marcação da proteína com FITC (Isotiocianato de Fluoresceína)

Para marcar a lectina de CFAL foi adicionado a um 1mg da amostra carbonato/bicarbonato 0,2 M pH 9,3 (1,5 mL), etilenoglicol (1,5 mL) e 50 μ L de FITC (0,05 mg/500 μ L), deixando-a sob agitação por 5 h á 4 °C, protegida da luz. A solução foi aplicada em coluna PD-10 (Pharmacia LKB), previamente equilibrada com N-butanol 5%. Após descarte de 2,5 mL do eluente, iniciou-se a coleta da proteína marcada (3,5 mL). A amostra obtida foi diálisada e liofilizada para as análise do item b.

b) Tratamento do fungo com a lectina marcada com FITC.

Para o tratamento do fungo com a lectina marcada utilizou-se o inóculo de esporos do fungo *Trichopyton rubrum* a uma concentração de 1×10^8 . Em seguida, 5 μL da lectina marcada (1mg/mL) foi adicionada à 45 μL de Tris-HCl 0,1M contendo NaCl 0,5 M pH 7,6 e 50 μL do inóculo. A amostra homogeneizada foi mantida em estufa a 37°C por 30 min, com posterior centrifugação. Para cada 50 μL do sobrenadante foi adicionado 500 μL de Tris-HCl 0,1M contendo NaCl 0,5 M pH 7,6 com subsequente agitação e centrifugação. Descartou-se 500 μL do sobrenadante e 50 μL dos esporos precipitados foram ressuspensos de onde foram coletados 6 μL e adicionados a 500 μL de Tris-HCl 0,1M contendo NaCl 0,5 M pH 7,6. Uma gota desta solução foi colocada em lâmina e os esporos foram visualizados em microscópio de fluorescência (Jeffs *et al.*, 1999).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição centesimal das sementes de *C. fairchildiana*

A composição química referente à 100g de farinha das sementes de *C. fairchildiana* está apresentada na Tabela 1. As análises do teor de umidade encontrado na farinha de sementes de *C. fairchildiana* 9,63% corresponde ao esperado para produtos farináceos de sementes de leguminosas. Azevedo, Morros e Alves (1989) encontraram um percentual de 9,81% para o de umidade nas sementes de *C. ternatea*, valores estes próximos ao encontrado na farinha de *Phaseolus vulgaris*, 11,7% (SANTOS *et al.*, 2009). O baixo teor de umidade das sementes de leguminosa é um fator importante pois protege-a de deterioração e torna-as menos susceptíveis a ataques de microrganismos, diminui o metabolismo intracelular favorecendo assim a preservação dos nutrientes de reserva.

As sementes de *C. fairchildiana* apresentam considerável teor de proteínas sendo um indicativo de uma potencial fonte proteica a ser investigada quanto a seu aspecto toxicológico e nutricional a fim de utiliza-la em dietas humana e/ou animal. Este resultado (30,13%) é semelhante aos encontrado para *Acacia caven* e *Acacia farnesiana* que apresentaram concentrações proteicas de 35,81% e 47,25%, respectivamente (CAVADA *et al.*, 1996). O teor de proteínas encontrado na semente estudada é superior aos de sementes oleaginosas comestíveis como amêndoa (21,41%), amendoim (24,03%), castanha de caju (18,81%) (FREITAS e NAVES, 2010). Aguiar *et al.* (2010) justificam sua escolha de estudar *C. fairchildiana* alegando apresentar altas concentrações de nitrogênio. É importante ressaltar que, além da quantidade de proteína presente nas sementes de *C. fairchildiana*, a qualidade desta proteína deve ser investigada avaliando a biodisponibilidade de aminoácidos essenciais. Sementes pertencentes ao mesmo gênero da espécie estudada apresentaram teores de proteína bruta de 39,15% (AZEVEDO, MORROS e ALVES, 1989).

Os teores de lipídeos foram superiores ao encontrado em sementes de *Bauhinia variegata* L., 16,41% (PINTO *et al.*, 2005) e em outra leguminosa utilizada na dieta humana, *Vigna unguiculata*, 3,08% (ARAÚJO, 1997). No entanto, o teor lipídico da semente investigada encontra-se próximo aos detectados em algumas sementes

oleaginosas já bem classificadas como amendoim (44,57%), amêndoa (41,04%) e castanha de caju (42,06%).

Tabela 1 - Composição centesimal das sementes de *Clitoria fairchildiana* referente à 100g de farinha.

Sementes de <i>C. fairchildiana</i>	
X ± DP	
Umidade (%)	9,63 ± 0,03
Proteínas (%)	30,13 ± 0,15
Lipídeos (%)	30,35 ± 3,29
Cinzas (%)	5,11 ± 0,01
Carboidratos (%)	24,78*

*Por diferença

5.2 Purificação da lectina de *C. fairchildiana*

A farinha das sementes de *C. fairchildiana* após delipidação foi submetida ao fracionamento por solubilidade proteica verificando apenas na fração glutelina ácida a presença de lectina detectada por atividade hemaglutinante com eritrócitos nativos de coelho após 12 h de contato (326,73 UH/mgPTN). As alterações promovidas pelo tratamento enzimático nas proteínas de membrana pode ter impedido a interação da hemaglutinina com os carboidratos. A lectina de CFAL não promoveu atividade hemaglutinante frente a hemácias humana do sistema ABO tratados e não tratados enzimaticamente. Esta resposta pode ser justificada pelo fato de que membrana de eritrócitos de coelho apresenta uma maior diversidade na composição de seus carboidratos, ou seja, diferentes oligossacarídeos e glicoconjugados. A distribuição destes carboidratos de membrana ocorre de forma assimétrica em células eucarióticas (Singer *et al.*, 2004). A complexidade e organização destes carboidratos podem estar promovendo melhor arranjo no sítio de ligação lectina-carboidrato possibilitando assim hemaglutinação. Este resultado difere do encontrado em sementes de *C. ternatea* que apresenta uma lectina capaz de aglutinar eritrócitos humanos tipo B tripsinizados (NAEEM, HAQUE e KHAN, 2007).

Não é comumente descrito na literatura a presença de lectina na fração glutelina ácida, porém algumas lectinas já foram estudadas e purificadas dessa fração. A fração proteica glutelina ácida das sementes de *Bauhinia forficata* apresentou atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina (FARIA *et al.*, 2004).

Ramos *et al.*, (2002) observaram atividade hemaglutinante de hemácias de coelho promovida pela fração glutelina ácida das sementes de *Cratylia floribunda*. Lectinas das sementes de *Acacia farnesiana* já foram isoladas da fração glutelina ácida e mostraram atividade hemaglutinante frente a hemácias de coelho (SILVEIRA, 2005).

A fração glutelina ácida foi submetida à cromatografia de troca-iônica DEAE-Sephacel, um trocador aniônico, em que foram obtidos dois picos cromatográficos. O primeiro pico, denominado pico não retido foi eluído com tampão de equilíbrio e não apresentou atividade hemaglutinante. Em seguida foi eluído o segundo pico, denominado pico retido eluído com NaCl 0,5 M, ativo frente a eritrócitos de coelho (Figura 4). A capacidade de hemaglutinação da CFAL continua sendo apenas observada após 12 h de contato com as hemácias.

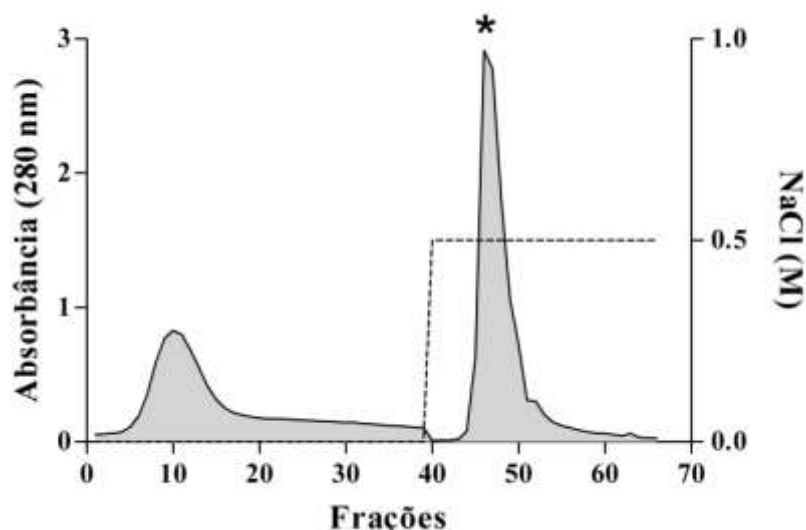


Figura 2 – Perfil de eluição da lectina de *C. fairchildiana* – Cromatografia em coluna de troca-iônica DEAE-Sephacel (8 x 1,5 cm²). Foram eluídas frações de 2,5 mL e monitoradas em 280nm. * Pico ativo

A cada 10mg da fração das glutelinas ácidas aplicada à coluna foram coletados 4,4mg da lectina de *C. fairchildiana* (CFAL), perfazendo quase 50% do total de proteína é constituída por CFAL. Este resultado também pode ser comprovado quando observamos os valores de atividade específica expostos na Tabela 2, bem como quando se compara o perfil eletroforético das duas amostras (glutelina ácida e pico retido DEAE) na Figura 5.

Tabela 2 – Atividade específica da lectina de *C. fairchildiana* após etapas de purificação

Etapas de Purificação	Volume (mL)	Dosagem* (mg/mL)	Massa Total da proteína** (mg)	Atividade Hemaglutinante (UH)	Atividade Total***	Atividade Específica*# (UH/mgPTN)
Glutelina Ácida	1	1,57	1,56	512	512	326,11
PII DEAE	1	3,30	3,30	2048	2048	620,61

* Considerando Fator do Bradford = 49,75; Equação da reta: $y = 0,0174x + 0,0561$

** Massa Total da Proteína = Volume x Dosagem

*** Atividade Total = UH x Volume

*# Atividade Específica = Atividade Total/ Massa Total

A fim de encontrar carboidratos específicos à CFAL, foi desenvolvido teste de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples e algumas glicoproteínas. Os açúcares e as glicoproteínas testadas não foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante da CFAL nas concentrações máximas destes possíveis ligantes (250 mM para açúcares simples e 2.500 µg/mL para glicoproteínas).

Algumas lectinas têm baixa afinidade para monossacarídeos ou dissacarídeos, devido à conformação espacial do sítio de ligação, e necessitam de moléculas mais complexas que favoreçam maiores interações químicas entre a lectina e o ligante (GABIUS *et al.*, 2011). Isto pode ser observado na lectina de sementes de *Eugenia uniflora*, que não é específica para carboidratos simples, mas é consideravelmente inibida por glicoproteínas presentes no soro fetal bovino, soro de coelho, tiroglobulina, caseína e fetuína (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Boleti *et al.*, (2007) purificaram e caracterizaram uma lectina de sementes de *Pouteria torta* tiveram sua atividade hemaglutinante revertida por glicoproteínas como fetuína, asialofetuína, heparina e ovalbumina (BOLETI *et al.*, 2007). Lectinas de *Acacia constricta* foram inibidas apenas por carboidratos complexos presentes em fetuína e tiroglobulina (Guzmán-Partida *et al.*, 2004).

Como a lectina de *C. fairchildiana*, existem outras aglutininas que são inespecíficas a alguns carboidratos de uso comum em análises laboratoriais e são denominadas *lectin-like*. Muitas delas já foram purificadas e tiveram suas funções biológicas estudadas. Como as lectinas-like presentes em sementes de *Pouteria torta* que exerceu efeito citotóxico seletivo para células tumorais, efeito inseticida e antifúngico (BOLETI *et al.*, 2007, 2008), BmLec, presente no veneno da *Bothrops moojeni* a qual promoveu significativa redução do crescimento bacteriano e induziu um significativo aumento da secreção de insulina (BARBOSA *et al.*, 2010).

Santi-Gadelha *et al.*, (2008) purificaram e caracterizaram estruturalmente uma lectina-like de sementes de *Acacia farnesiana* presente na fração albumínica que apresentava atividade anti-inflamatória.

A fração glutelina ácida e o pico retido da cromatografia de troca iônica foram submetidos à eletroforese redutora para observação do grau de pureza e do perfil proteico das amostras estudadas. Na Figura 3 podemos observar que a CFAL apresenta um padrão molecular de duas bandas com massa molecular aparente de 100 e 116 kDa.

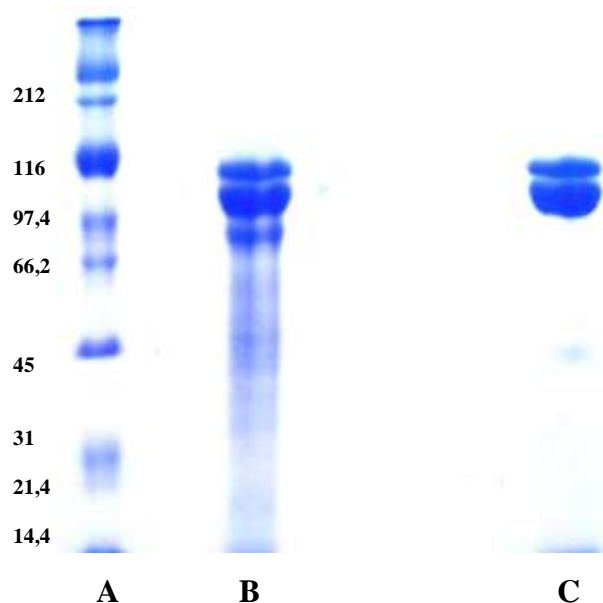


Figura 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS a 12,5% corado do Comassie Brilliant Blue em condições redutoras; linha A: marcador de peso molecular: miosina (212kDa), β -galactosidase (116kDa), fosforilase B (97,4kDa), albumina sérica bovina (66,2kDa), ovalbumina (45kDa), anidrase carbônica (31kDa), inibidor de tripsina da soja (21,4kDa) e lisozima (14,4kDa); linha B: Glutelina ácida; linha C: Pico ativo da cromatografia de troca iônica DEAE.

A lectina de *C. fairchildiana* foi investigada quanto a presença de carboidratos em sua constituição e verificamos ser positiva para o teste de Molisch indicando ser esta uma glicoproteína. Este método detecta monossacarídeos na amostra produzido pelo rompimento ácido de carboidratos mais complexos. Estes monossacarídeos gerados podem ser visualizados na presença de um indicador, o α -naftol conhecido com Reativo de Molisch. A lectina de *C. fairchildiana* mostrou-se PAS (+) (Figura 4), indicando sua natureza glicoproteica confirmando os resultados anteriores. A quantificação de carboidratos ligados à CFAL foi mensurado pelo método de Dubois *et al.*, (1956) mostrando uma concentração de 3,95% de carboidratos solúveis. A alta concentração de

carboidratos aliado a necessidade de altas concentrações de NaCl sugerem que a CFAL é uma proteína hidrofóbica. Outras lectinas como as isoladas de *Bauhinia Monandra* (SOUZA *et al.*, 2011) e de *Luetzelburgia auriculata* (OLIVEIRA *et al.*, 2002) também são classificadas como glicoproteínas.

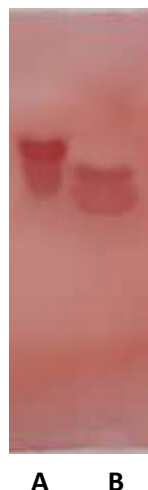


Figura 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS marcada com ácido periódico de Schiff. Linha A: fetuína suína; linha B: lectina de *C. fairchildiana*.

Outras lectinas já foram descritas como glicoproteínas como as lectinas vegetais de *Arisaema tortuosum* (DHUNA *et al.*, 2005), de *Kaempferia rotunda* Linn. (Kabir *et al.*, 2011), e a de *Nymphaea nouchali* (KABIR *et al.*, 2011), e outras lectinas animais como as isoladas de ovos de cavala *Scomberomorous niphoniusum* específica para ramnose (TERADA *et al.*, 2007), a lectina-like de *Trypanosoma cruzi*, também denominada glicoproteína que pode ser utilizada no diagnóstico de Doença de Chagas com sensibilidade de 98%.

5.3 Caracterização físico-química da CFAL

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) é uma técnica capaz de investigar tamanho de partículas em solução. Partículas suspensas em meio líquido movem-se ao acaso, partículas menores movem-se mais rapidamente que as maiores. Estas movimentações geram espalhamento de luz diferentes (LUCAS, SOARES E MONTEIRO, 2001). Na proteômica, esta técnica é comumente utilizada para análise de homogeneidade de amostras que estão em processo de cristalização diferenciando

agregação de proteína organizada na forma de cristalitos, bem como para caracterização de interações entre biomoléculas incluindo oligomerizações (STONE *et al.*, 2007).

A análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) foi desenvolvida para observação do comportamento estrutural da CFAL em diferentes concentrações salinas, bem como comprovar sua massa molecular. Os resultados indicam que a lectina de *C. fairchildiana* apresentou melhor estabilidade na concentração de NaCl de 75% apresentando-se como amostra monomodal com raio hidrodinâmico (R_H) de 4,5 nm, onde foi possível verificar a presença de 99% da massa total de proteína. Estes valores de R_H correspondem a associações moleculares com massa molecular de aproximadamente 115 kDa (Figura 8), resultado semelhante ao encontrado em SDS-PAGE. Na ausência de força iônica não se observou a formação de amostras monomodais, ao passo que com o aumento gradual da força iônica (25%, 50%, 75% e 100% de NaCl) observou-se organização da proteína em solução com obtenção de amostras monomodais mais estáveis (Figuras 6, 7, 8 e 9).

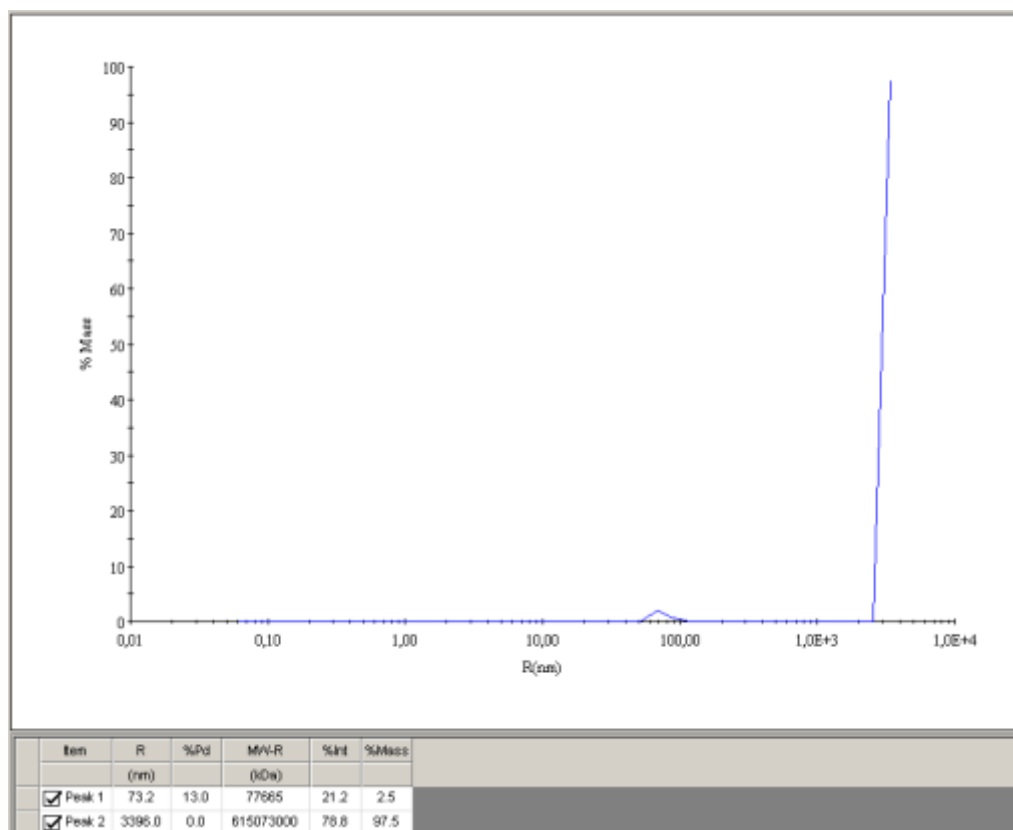


Figura 5 - Distribuição da amostra de CFAL no Espalhamento Dinâmico de Luz sem força iônica (NaCl 0%).

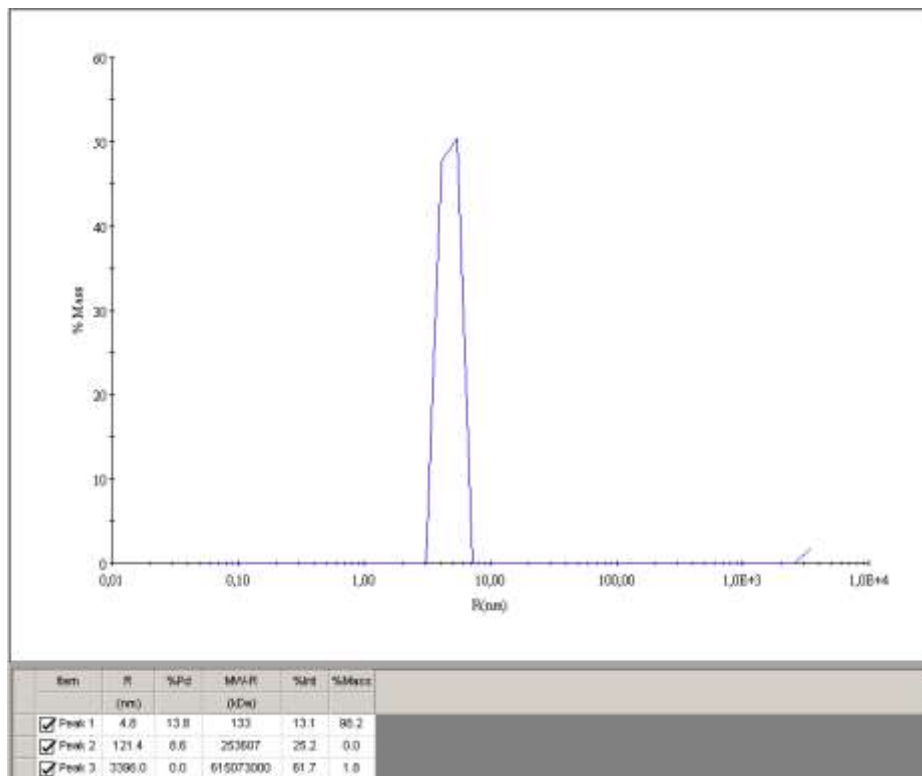


Figura 6 - Distribuição da amostra de CFAL no Espalhamento Dinâmico de Luz em uma concentração salina de 25% (NaCl).

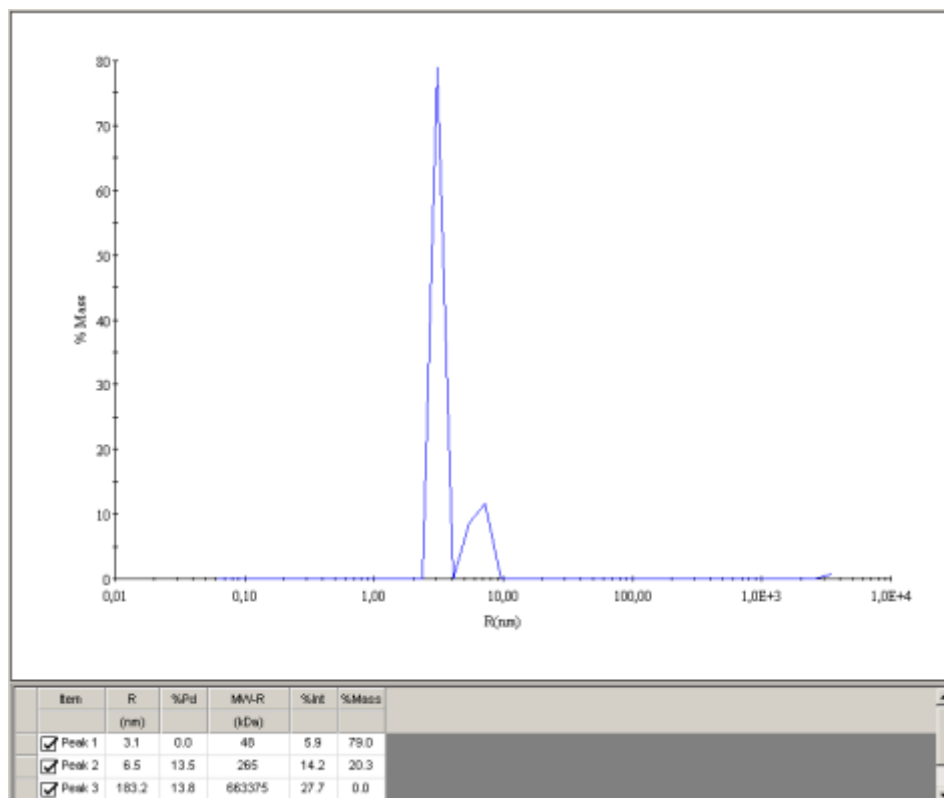


Figura 7 - Distribuição da amostra de CFAL no Espalhamento Dinâmico de Luz em uma concentração salina de 50% (NaCl).

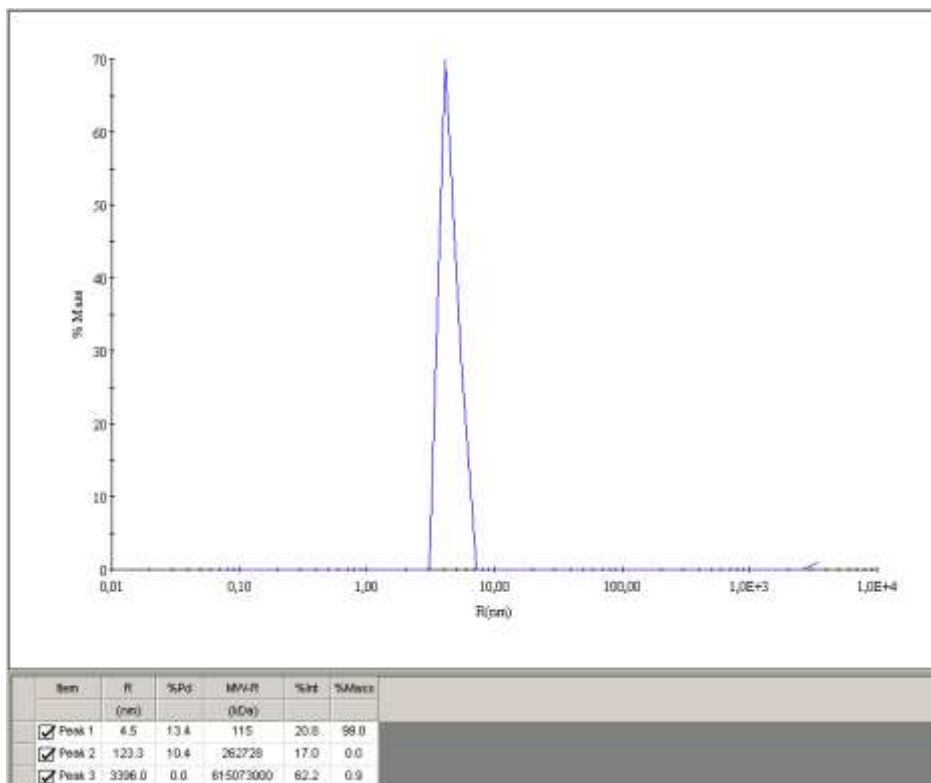


Figura 8 - Distribuição da amostra de CFAL no Espalhamento Dinâmico de Luz em uma concentração salina de 75% (NaCl).

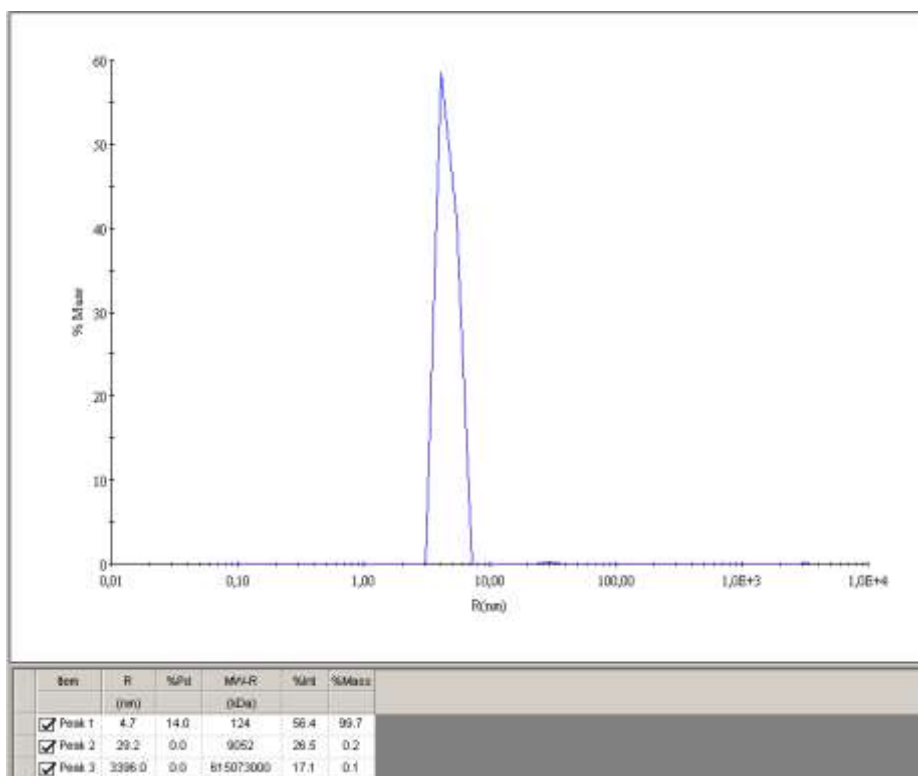


Figura 9 - Distribuição da amostra de CFAL no Espalhamento Dinâmico de Luz em uma concentração salina de 100% (NaCl).

O teste de resistência à degradação enzimática mostra que as concentrações utilizadas no experimento das enzimas proteolíticas tripsina, papaína e bromelaína não foram capazes de inativar a lectina de *C. fairchildiana*. Dados sobre a resistência de outras lectinas à degradação por enzimas proteolíticas já foram apresentados.

Resultados semelhantes foram encontrados por Zanetti (2007), onde a lectina de *Arundo donax* resistiu à ação proteolítica de tripsina, quimiotripsina e pepsina. A lectina de *Ganoderma capense* manteve sua atividade após tratamento com tripsina, porém em uma concentração inferior (100 µM) a utilizada no teste com CFAL (PATRICK; NGAI, 2004). Zhu-Salzman et al. (2002) demonstrou que a lectina de *Griffonia simplicifolia* resistiu à clivagem proteolítica da papaína, no entanto foi inativada pela ação de tripsina. Diferentemente, a lectina de *B. monandra* é resistente à ação de tripsina, mas é inativada pela atuação de papaína e pepsina (MACEDO et al., 2007).

Estudos imunohistoquímicos detectaram a presença da lectina de *Galanthus nivalis* ligadas à mucosa intestinal de ratos alimentados com dietas artificiais contendo a lectina, bem como aderidas ao tecido adiposo, ovários e hemolinfa (POWELL et al., 1998). Lectinas de *Moringa oleífera* mostraram-se resistentes à ação de enzimas digestivas de insetos (OLIVEIRA et al., 2011).

Devido a esta resistência da CFAL à ação de enzimas proteolíticas, pode-se pensar em ação inseticida da lectina. No entanto, sua utilização na dieta animal ou humana, a CFAL pode atuar como fator antinutricional, ou até mesmo exibir efeitos sistêmicos, se internalizadas. No entanto, estudos adicionais, *in vivo*, devem ser realizados para comprovação desta característica.

Para verificar a ação do agente quelante EDTA sobre a atividade lectínica da CFAL, submeteu-se a amostra a ação deste agente o qual foi capaz de inativar a hemaglutinação da lectina. A posterior adição dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} não foram capazes de reverter à ação do agente quelante. No entanto, quando adicionados CaCl_2 a 1,25 mM, a hemaglutinação pôde ser observada (Tabela 3).

Lectinas que dependem de íons metálicos para exercerem sua ação são denominadas metaloproteínas. (MOREIRA, 1991). A presença destes íons promove estabilidade ao sítio de ligação da proteína ao carboidrato específico. O EDTA é um composto orgânico, quelante, que forma complexos muito estáveis com diversos íons metálicos.

O tratamento da lectina de *C. fairchildiana* com EDTA (250mM) e com íons divalentes interferiram em sua atividade hemaglutinante. Porém, baixas concentrações de íons Ca^{2+} (1,25mM) não foram capazes de alterar a atividade hemaglutinante da lectina (Tabela 3). ~~porém esta lectina deve apresentar íons inerentes à molécula que a estabilizam~~ ~~estes acima do limiar podem desestabilizar a proteína promovendo sua inativação~~ Dhuna *et al.* (2005) caracterizaram uma glicoproteína de *Arisaema tortuosum* relatando sua não dependência à íons divalentes.

Kabir *et al.* (2011), em estudo desenvolvido com a lectina de *Kaempferia rotunda* Linn., demonstraram ser um glicoproteína íon-dependente, semelhante ao observado por Kabir *et al.* (2011), para a lectina de *Nymphaea nouchali*, também uma glicoproteína Ca^{2+} -dependente. Já a lectina de *Agrocybe cylindracea*, apresentou diminuição de sua atividade hemaglutinante após tratamento com o agente quelante e com íons divalentes (LI *et al.*, 2008).

Tabela 3 – Efeito do EDTA e dos íons divalentes Ca^{+2} e Mn^{+2} sobre atividade hemaglutinante da lectina de *C. fairchildiana* (CFAL).

Tratamento	Atividade Hemaglutinante
CFAL + EDTA	-
CFAL + EDTA + CaCl_2	-
CFAL + EDTA + MnSO_4	-
CFAL + CaCl_2	+*
CFAL + MnSO_4	-

*Apenas na concentração de 1:32 (v:v)

Para testar a resistência da lectina frente a agentes desnaturante, redutor e oxidante, realizamos a exposição da mesma frente à uréia, β -mercaptoetanol e metaperiodato de sódio. Na Tabela 4 estão expostos os resultados do tratamento da CFAL com os compostos desnaturante, redutor e oxidante. Os agentes desnaturante e redutor a uréia e o β -mercaptoetanol não foram capazes de inativar a lectina de *C. fairchildiana*. As concentrações dos agentes (8 mM e 10mM, respectivamente) podem não ter sido suficientes para promover alteração na estrutura da proteína, conseqüentemente não interferindo na sua atividade hemaglutinante. Lectina de *Moringa oleifera* mostraram resistir a tratamento com uréia 3M (KATRE *et al.*, 2008), e apenas o tratamento com uréia 6M foi capaz de promover desnaturação da lectina de

Griffonia simplicifolia, concentrações inferiores não afetaram a proteína (ZHU-SALZMAN *et al.*, 2002).

O metaperiodato de sódio é um agente oxidante capaz de promover alterações irreversíveis em carboidratos (FERREIRA *et al.*, 2008). A CFAL possui uma porção glicídica que sofre alteração quando tratada com metaperiodato de sódio verificada pela inativação da atividade hemaglutinante (Tabela 4). Portanto, pode-se inferir que a porção glicídica da glicoproteína pode atuar na atividade hemaglutinante promovendo melhor adequação do sítio de ligação da lectina ao carboidrato de membrana.

Biroc e Etzler (1978) relataram que o tratamento da lectina de *Dolichos biflorus* com periodato promove destruição de 16% de seus resíduos de manose, porém esta alteração não impede a atividade hemaglutinante da lectina frente a eritrócitos tipo A. Os autores ainda ressaltam que algumas moléculas podem manter sua atividade mesmo sofrendo alteração de sua porção glicídica e o periodato pode afetar tanto a porção proteica da molécula, como seus carboidratos.

O tratamento com metaperiodato de sódio das lectinas de *Macrophomina phaseolina* (BHOWAL *et al.*, 2005) e de *Belamya bengalensis* (BANERJEE *et al.*, 2004) ocasionou significativa diminuição da suas atividades hemaglutinantes.

Tabela 4 – Efeito dos agentes desnaturante, redutor e oxidante sobre a atividade hemaglutinante da lectina de *C. fairchildiana* (CFAL).

Agentes	Atividade Hemaglutinante
Uréia	+
β -mercaptoetanol	+
Metaperiodato de sódio	-

A lectina de CFAL foi submetida à variação de pH e podemos observar que estas alterações afetaram a atividade hemaglutinante (Tabela 5). A lectina foi inibida em condições neutras e ácidas, porem em meio básico foi capaz de promover e potencializar a hemaglutinação sendo observada em um menor tempo de exposição da lectina frente eritrócitos, ou seja, apenas 1 h após realização do teste de atividade hemaglutinante.

Sabe-se que ácidos e bases são conhecidos por promoverem desnaturação de proteínas, pois afetam suas interações eletrostáticas. A protonação das cadeias laterais ionizáveis em pH abaixo de 3,0 induz repulsão entre cargas trazendo como

consequência o desdobramento da proteína (NAEEM, SALEEMUDDIN e KHAN, 2009). Porém, a CFAL não apenas resistiu à ação da adição de base como sua atividade hemaglutinante foi consideravelmente mais efetiva. Isto pode ser explicado devido ao acréscimo de Na à solução lectínica por meio da adição de NaOH para promover mudança do pH. Este fornecimento de sódio ao meio pode ter auxiliado na melhor estruturação da lectina obtendo-se resultado de aglutinação mais rapidamente. Esta dependência de sal apresentada pela lectina é corroborada pelos dados encontrados no espalhamento dinâmico de luz (Figura 6).

Algumas lectinas exigem meios mais ácidos para exercerem sua função, outras atuam melhor em meio alcalino como observado na CFAL. Existe também, as que atuam em uma ampla faixa de variação de pH e as que suportam apenas pequenas alterações de pH as quais não as desestabilizam. Naeem, Saleemuddin e Khan (2009), observaram que a variação de pH ocasiona alteração da estrutura da lectina de *C. ternatea* com conseqüente efeito sobre a atividade onde em determinada faixa de pH a sua atividade é reduzida em 50%. Lectina de *Moringa oleifera* foi purificada e caracterizada mostrando ser estável a ampla faixa de pH de 4,0 - 9,0 (SANTOS *et al.*, 2009). Lectina de sementes de *Trichosanthes cordata* galactose-específica apresentou atividade hemaglutinante considerável na faixa de pH entre 7,0 e 11,0 e esta atividade foi reduzida a menos de 20% em pH 5,0 (SULTAN, KAVITHA e SWAMY, 2009).

Tabela 5 – Efeito da variação pH sobre a atividade hemaglutinante da lectina de *C. fairchildiana* (CFAL).

pH	Atividade hemaglutinante
1,7	H*
2,5	-
3,7	-
4,4	-
5,5	-
6,9	-
7,2	-
8,0	+
9,0	+
10,6	+
11,0	+
12,0	+
13,0	H

*Hemólise

A lectina de *C. fairchildiana* mostrou-se resistente à ação térmica sendo inativada após 30 minutos a 100°C. São descritas na literatura algumas lectinas resistentes a temperaturas mais elevadas como a lectina de *Agaricus arvensis* a qual apresentou atividade hemaglutinante após tratamento térmico de 90°C (ZHAO *et al.*, 2011), lectina de *Archidendron jiringa* que manteve sua atividade hemaglutinante após tratamento térmico de 80°C por 10 minutos, reduzindo esta atividade para 20% apenas após tratamento com 90°C por 20 minutos (VIROUNBOUNYAPAT, KARNCHANATAT, e SANGVANICH, 2012). Lectina de *Erythrina speciosa* quando aquecida a 80°C durante 10 minutos foi completamente inativada (KONOZY *et al.*, 2003).

5.4 Atividade antinociceptiva da CFAL

Quanto a sua capacidade de redução da nocicepção, doses de CFAL reduziu o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em 35% a 0,1 mg/kg ($22 \pm 6,81$), de 70% a 1 mg/kg ($10,25 \pm 3,54$) e em 72% a 10mg/kg ($9,37 \pm 2,27$) comparados com o controle ($34 \pm 2,63$ contorções) (Figura 10A).

A nocicepção é induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético o qual, ativa nociceptores quimiossensíveis levando à liberação de mediadores inflamatórios, tais como a histamina, bradicinina, prostaglandinas e serotonina (SCHOWB e DUBOST, 1984; GARCIA *et al.*, 2004).

No teste da formalina a CFAL (10 mg/kg) mostrou efeito nociceptivo significativo, reduzindo em 43% ($89,25 \pm 18,64$ m) o tempo de lambida induzida por formalina ($157,25 \pm 21,87$ s), na fase inflamatória do teste (Figura 10B). CFAL não alterou a fase neurogênica do teste.

O teste da formalina é amplamente utilizado na avaliação da ação de fármacos analgésicos, sendo considerado um modelo confiável de dor inflamatória (ABBOTT, FRANKLIN e WESTBROOK, 1995). A primeira fase do ensaio, denominada fase neurogênica, ou seja, tem ação em nível de sistema nervoso central, duração de 5 a 10 minutos e envolve a estimulação direta de nociceptores e liberação de substância P. A segunda fase, denominada fase inflamatória, iniciada após a primeira tendo duração de 20 a 40 minutos, é desencadeada por uma combinação de estímulos envolvendo mediadores químicos (OMOTE *et al.*, 1998).

Drogas analgésicas opióides inibem as duas fases do teste da formalina, enquanto que os anti-inflamatórios (analgésicos não-opioides) inibem especialmente a segunda fase (HUNSKAAR e HOLE, 1987). Assim, pode-se inferir que a ação antinociceptiva da CFAL está associada à ação antiinflamatória.

Este resultado difere do encontrado por Silva *et al.* (2010) para lectina da alga *Pterocladia capilacea*, Figueiredo *et al.* (2009), para a lectina de *Canavalia boliviana* e Coura *et al.* (2012) para lectina de *Gracilaria córnea*, as quais apresentaram efeito antinociceptivo por diminuição do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético e inibição da nocicepção nas duas fases do teste da formalina.

Semelhante aos resultados encontrados para a lectina de *C. fairchildiana*, as lectinas de *Caulerpa cupressoides* (VANDERLEI *et al.*, 2010), reduziu o número de contorções abdominais e inibiu a segunda fase do teste da formalina, ao passo que a lectina de *Crataeva tapia* diminuiu o número de contorções induzidas por ácido acético (ARAÚJO *et al.*, 2011).

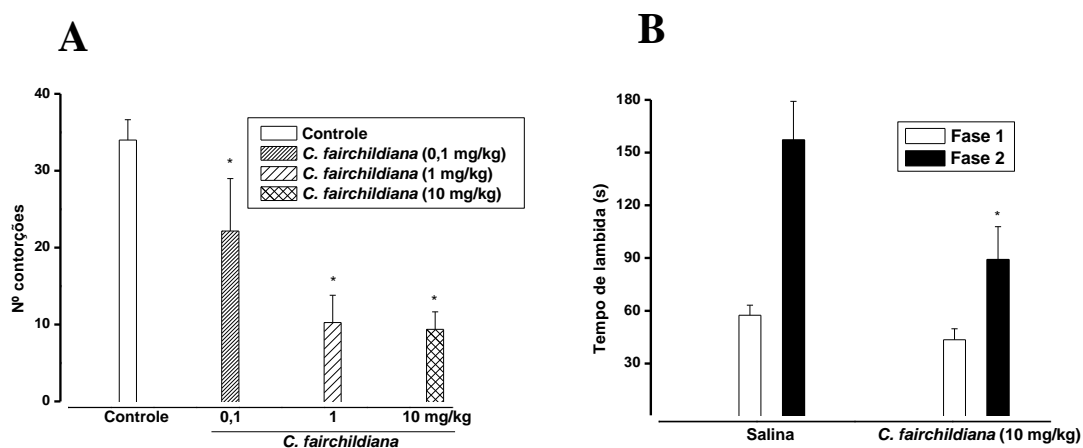


Figura 10 – Efeito anti-nociceptivo da lectina de *C. fairchildiana*. A) Lectina de *C. fairchildiana* (0,1; 1 e 10mg/kg; i.v.) injetada 30 minutos antes da injeção de ácido acético 0,8% (v/v; i.p.). O grupo controle recebeu apenas ácido acético. B) Lectina de *C. fairchildiana* (10 mg/kg) injetada i.v. 30 min antes da formalina (1,5% v/v; s.c.). Média \pm S.E.M. (n=8). * $p < 0.05$ comparado ao controle. ANOVA e teste de Bonferroni.

5.5 Atividade inflamatória

O efeito antiinflamatório da CFAL avaliado pelo o método de edema de pata induzido por carragenina é mostrado na Figura 11. O edema de pata induzido por carragenina atingiu níveis máximos ($0,73 \pm 0,10$ mL) 4 horas após a administração com redução nas horas subsequentes comparados ao grupo salina ($0,13 \pm 0,037$ mL) por via endovenosa. O tratamento dos animais com a lectina de *C. fairchildiana*, intraperitonealmente, reduziu significativamente o edema em todas as doses testadas. O maior índice de inibição foi observado para o grupo dos animais que receberam $0,015$ mg/kg ($0,067 \pm 0,21$ mL) de CFAL após 4 horas do estímulo com o agente flogístico (Figura 11A).

Na Figura 11B observa-se inibição do edema em 71%, 68% e 46% nas concentrações testadas ($0,015$; $0,15$ e $1,5$ mg/kg, respectivamente) baseada na Área Sobre a Curva (ASC). Carragenina é um agente flogístico que induz edema bifásico com duração de 6 horas. As duas primeiras horas ocorrem com a participação de histamina e serotonina sendo liberada de mastócitos, a segunda fase, de 3 a 6 horas envolve infiltração de neutrófilos e liberação de PGE2, citocinas (principalmente IL-1 β) e óxido nítrico (KULINSKY, 1969).

A lectina de *C. fairchildiana* apresentou efeitos antiinflamatórios através do método de edema de pata induzido por carragenina, tais efeitos parecem estar associados com a inibição da migração neutrofilica. A carragenina também provoca aumento da permeabilidade vascular e da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal através da ativação de macrófagos e mastócitos (SOUZA et al., 1988). A administração da dose máxima da CFAL ($1,5$ mg/kg) não foi capaz de promover alteração da permeabilidade vascular como pode ser observado na Figura 11C.

No modelo de peritonite, a CFAL, na concentração de $0,015$ mg/kg foi capaz de reduzir em 29% a migração de neutrófilos (neutrófilos: $6,410 \pm 238$) e em 20% a migração de células mononucleares ($1,409 \pm 117$), para a cavidade peritoneal induzidas por carragenina (neutrófilos: $6,410 \pm 238$; células mononucleares: $1,409 \pm 117$) (Figura 11D).

Este resultado corrobora com o encontrado no modelo de edema de pata induzido por carragenina, onde a lectina inibia principalmente a segunda fase do edema onde há presença de infiltrado rico em leucócitos, sem interferir no aumento da permeabilidade

vascular. Santodomingo-Garzón *et al.*, (2006) demonstram que a diminuição da migração de neutrófilos reduz nocicepção induzida por diferentes estímulos promotores de inflamação.

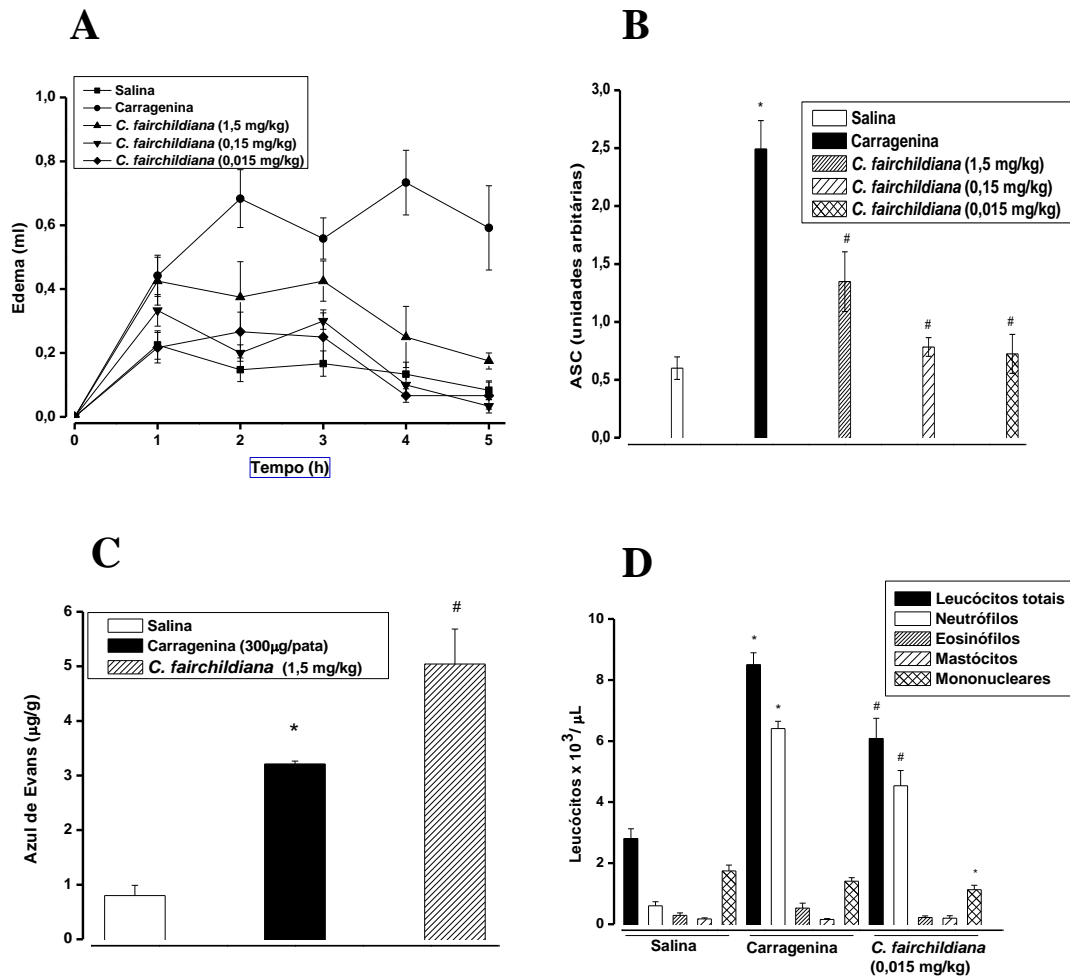


Figura 11 – Efeito antiinflamatório da lectina de *C. fairchildiana*. CFAL (0,015; 0,15 e 1,5 mg/kg) foi injetada 30 min antes da carragenina 300µg/pata. A) Evolução do edema nas 6 primeiras horas (mL); B) Área sobre a Curva – ASC (unidades arbitrárias); C) Permeabilidade Vascular (µg/g Azul de Evans); D) Migração leucocitária ($\times 10^3/\mu\text{L}$). Média \pm S.E.M. (n=6). * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo; # $p < 0,05$ comparado ao controle positivo. ANOVA e teste de Bonferroni.

Acredita-se que o efeito antinociceptivo da CFAL pode estar associado com seu efeito inibitório de migração neutrofílica. Figueiredo *et al.* (2009) apresenta a lectina de *C. boliviana* com atividade antinociceptiva associada ao efeito inibidor sobre a migração de neutrófilos.

Várias lectinas já foram descritas na literatura como exercendo efeito anti-inflamatório como a lectina de alga vermelha *Hypnea cervicorni* que mostrou ação anti-inflamatória por diminuição da migração de neutrófilos (FIGUEIREDO *et al.*, 2010), lectinas de *Lonchocarpus sericeus* que foi capaz de diminuir a migração de leucócitos e hipernocicepção por inibição de citocinas e produção de quimiocinas (Napimoga *et al.*, 2007).

5.6 Atividade hemolítica e fragilidade osmótica

É importante a investigação do efeito citotóxico de lectinas sobre eritrócitos humanos, pois apesar da CFAL não promover hemaglutinação de eritrócitos humanos, poderiam exercer ação hemolítica sobre estes, fato este indesejável quando se trata de uma molécula com considerável ação biológica. A lectina de *C. fairchildiana* não promoveu danos à membrana de células sanguíneas humanas visto que induziu baixa atividade hemolítica frente a eritrócitos humanos tipos A (0% em todas as concentrações), B (3,46% a uma concentração de 1000 µg/mL) e O (2,09%, 1,74%, e 1,04% 5,4%, em concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL, respectivamente). Não foi calculado a HC₅₀ (Concentração Hemolítica Média) uma vez que os percentuais de hemólise observados foram inferiores a 20%. Como já mencionado anteriormente, a CFAL é uma lectina capaz de aglutinar eritrócitos de coelho, mas não promove aglutinação de eritrócitos humanos, porém lectinas podem promover diferentes efeitos sobre membrana de eritrócitos. Algumas podem ser capazes de exercer atividade hemolítica em eritrócitos de coelho e humano sem, porém, promover hemaglutinação dos mesmos (HATAKEYAMA *et al.*, 1994), como também exercer sua ação citotóxica em alguns tipos celulares, porém outras células não serem sensíveis a este efeito (KURAMOTO *et al.*, 2005).

Outros compostos apresentam considerável atividade hemolítica como descrito por Dresch *et al.* (2005) em estudo desenvolvido com extratos de *Petromica citrina* e *Acervochalina* sp. que observaram promoção de hemólise em eritrócitos de diferentes espécies animais e este efeito foi reduzido em 50% após aquecimento do extrato de *Acervochalina* sp. a 100 ° C, durante 10 min, indicando que o fator promotor desta atividade hemolítica mostrou-se susceptível a variação de

temperatura. Compostos terpenóides de esponjas marinhas apresentaram valores de HC_{50} variando de 10 a 60 $\mu\text{g/mL}$ frente a eritrócitos de ratos (PROKOF'EVA et al., 2004).

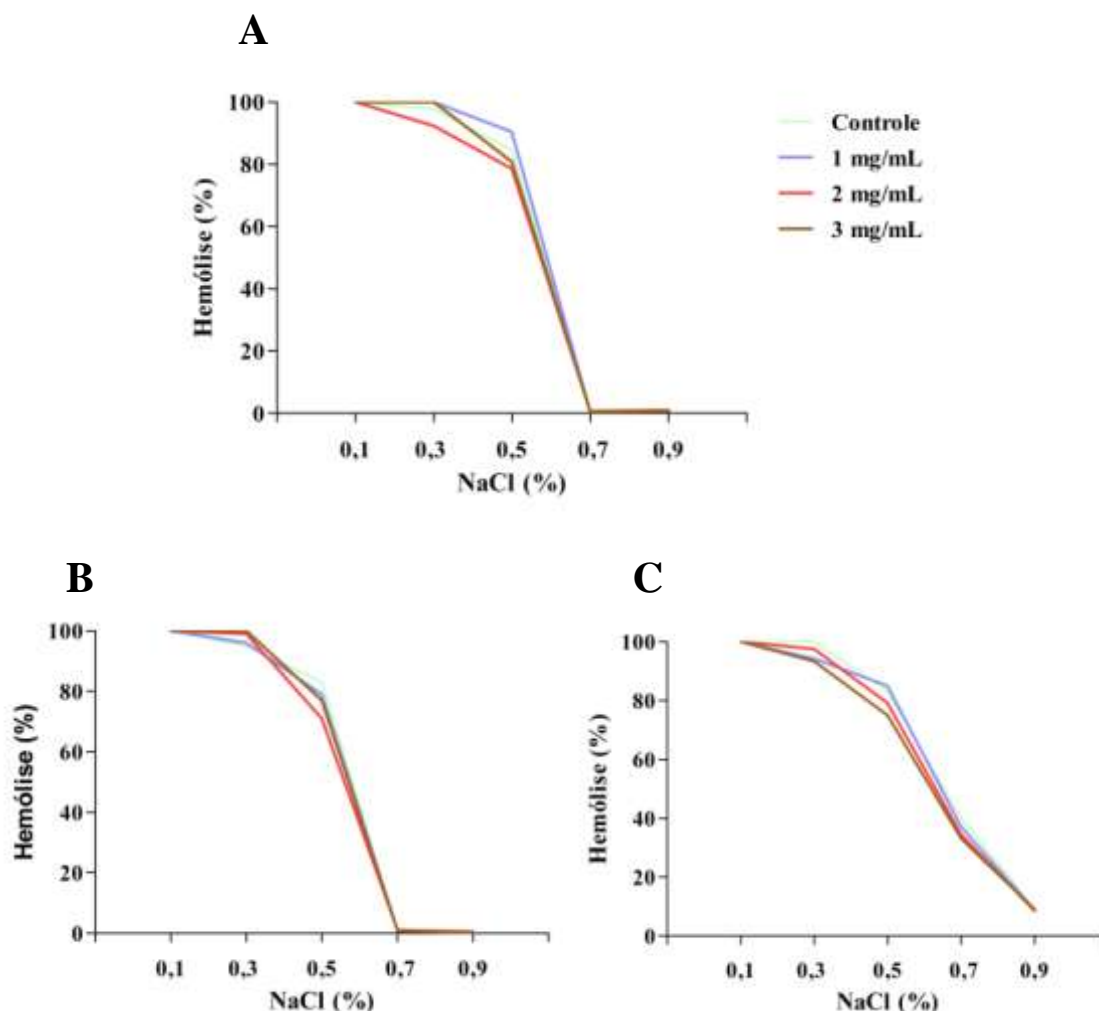


Figura 12 – Fragilidade Osmótica da Lectina de sementes de *C. fairchildiana*. A) Eritrócitos humanos tipo O; B) Eritrócitos humanos tipo A; C) Eritrócitos humanos tipo B.

A realização de testes *in vitro* para análise da inalteração das propriedades celulares é o passo inicial para a avaliação da compatibilidade biológica de uma substância (ROGERO *et al.*, 2003). Portanto, para futuras aplicações clínicas da CFAL é fundamental a baixa citotoxicidade desta molécula frente a eritrócitos humanos.

Experimentos de fragilidade osmótica têm sido desenvolvidos para observação da interação de drogas naturais e sintéticas com a membrana de eritrócitos (MAIWORM

et al., 2008). A resistência das células vermelhas à hemólise caracteriza-se como sendo fragilidade osmótica. O efeito das lectinas em eritrócitos pode tanto promover fragilidade da hemácia decorrente da interação lectina–membrana eritrocitária, interação esta capaz de alterar suas propriedades, como impedir a lise celular quando estas células são expostas a ambientes hipotônicos (GRUPTA *et al.*, 2006). Considerando a não atividade hemolítica da lectina de *C. fairchildiana*, é necessária também a investigação quanto a sua ação sobre a fragilidade osmótica de células sanguíneas.

Como observado na Figura 12 as diferentes concentrações da lectina de *C. fairchildiana* testadas não promoveram hemólise dos eritrócitos humanos do Sistema ABO, no entanto, também não foram capazes de protegê-los de hemólise quando estas hemácias eram colocadas em condições hipotônicas. Diferentemente do encontrado por Pande *et al.* (1998), que mostrou aumento da fragilidade osmótica de eritrócitos de coelho das lectinas de *Lens culinaris* e *Canavalia ensiformis*.

Extratos de *Hypericum perforatum* e *Mentha crispera* promoveram mudança na fragilidade osmótica de células sanguíneas sugerindo efeito sobre permeabilidade e estrutura da membrana (BERNARDO-FILHO e SANTOS-FILHO, 2009).

5.7 Ação oxidante e antioxidante em eritrócitos humanos

A oxidação de eritrócitos promove modificação da hemoglobina presente nestes a qual é transformada em metahemoglobina. O potencial oxidante de um composto pode ser avaliado quantificando a concentração de metahemoglobina formada. A CFAL não exerceu efeito oxidante em eritrócitos humanos tipo O em todas as concentrações testadas (1, 10, 100 e 1000µg/mL) visto que induziu uma baixa produção de metahemoglobina (0,67%, 0,78%, 0,74% e 0,92%, respectivamente) comparada aos eritrócitos tratados com fenilhidrazina (PH). Valores entre 1,9% e 2% são considerados normais.

Quando os eritrócitos foram previamente tratados com CFAL antes da exposição à fenilhidrazina não houve diminuição das concentrações metHb comparadas ao controle, o qual as hemácias não receberam tratamento com a lectina. Este resultado indica que a lectina de *C. fairchildiana* não exerceu ação antioxidante.

Investigação realizada com extratos de sementes de *C. fairchildiana* indicou altas concentrações de compostos fenólicos e de taninos os quais estão relacionados à ação antioxidante dos extratos (ANNEGOWDA *et al.*, 2011).

5.8 Atividade antibacteriana

Lectinas podem inibir o crescimento bacteriano por se ligarem a parede celular da bactéria causando modificações (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006). As análises *in vitro* do efeito da CFAL contra bactérias patogênicas e não patogênicas indicaram que a CFAL não afetou o crescimento das bactérias patogênicas avaliadas, no entanto reduziu, significativamente, o crescimento da bactéria saprófita *Bacillus subtilis* (Figura 13), observado apenas pelo método de microdiluição. Kawsar *et al.* (2010) demonstraram que a lectina de *Halichondria okadai* inibiu o crescimento bacteriano apenas das bactérias não patogênicas para humanos *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*, não alterando o crescimento de *Salmonella typhi* e *Escherichia coli*.

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram-positiva, saprófita comum no solo e na água. É uma bactéria não patogênica. Vem sendo estudada por exercer efeito no controle biológico de fitopatógenos, promovendo proteção ao vegetal.

Apesar desta lectina, ter apresentado efeito apenas contra a bactéria Gram-positiva encontradas em solo e água, esta proteína pode apresentar ação contra fitopatógenos que não foram testados aqui, podendo exercer um papel importante na defesa de plantas contra o ataque microbiano.

Muitas lectinas têm demonstrado efeito inibitório do crescimento bacteriano. Gaidamashvili e Staden (2002) relataram ação antibacteriana em cinco lectina-like de plantas medicinais do sul da África, onde todas promoveram redução do crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Oliveira *et al.*, (2008) purificaram uma lectina da semente de *Eugenia uniflora* e observaram que doses mínimas (1 µg/mL) desta proteína foi capaz de inibir o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Bacillus subtilis*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Corinebacterium bovis* e *Escherichia coli*.

Embora o mecanismo de ação do efeito antibacteriano das lectinas ainda não seja esclarecido, propõe-se que a sua interação seletiva a carboidratos induza a formação de um canal na membrana celular bacteriana, e causa um extravasamento do

conteúdo celular, indicando então, a presença de um mecanismo de ação diferente dos antibióticos clássicos usados na terapêutica (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Nunes *et al.* (2011) demonstraram atividade antibacteriana de uma lectina purificada do veneno da serpente *Bothrops leucurus*, que apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis* com concentrações inibitórias mínimas de 31,25; 62,25 e 125 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente. A lectina animal de *Aplysia kurodai* inibiu significativamente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus megaterium* (KAWSAR *et al.* , 2010).

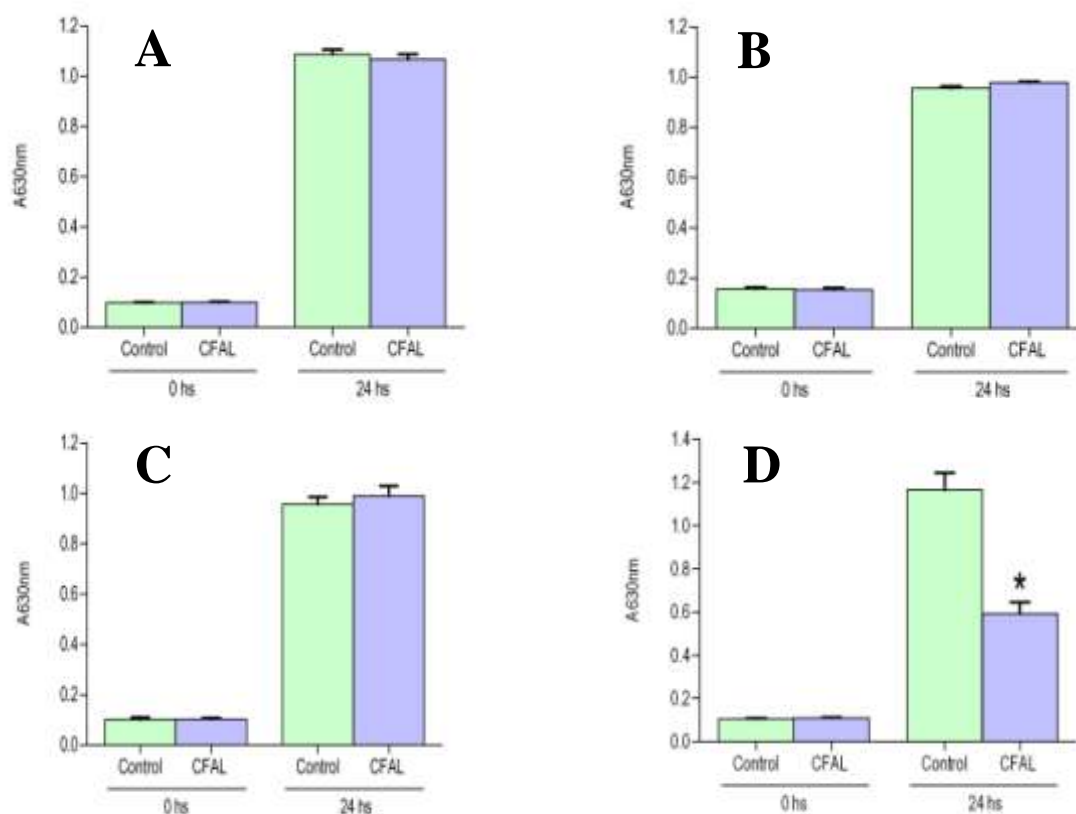


Figura 13 – Efeito da lectina de *C. fairchildiana* sobre o crescimento bacteriano. A) *Pseudomonas aeruginosa*, B) *Escherichia coli*, C) *Staphylococcus aureus* e D) *Bacillus subtilis*. Concentração de CFAL de 1000 $\mu\text{g}/\text{poço}$. Os dados estão representados pela média \pm desvio padrão de três experimentos. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

5.9 Atividade antifúngica

Fungos dermatófitos são filamentosos, formando hifas organizadas em micélios. Alimentam-se de queratina, podendo proliferar na pele, pêlos, cabelos e unhas. Existe três gêneros relacionados a fungos dermatófitos, sendo eles: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (PEREIRA, 2001).

A lectina de *C. fairchildiana* não promoveu inibição do crescimento dos fungos dermatófitos testados. Este resultado difere do encontrado por Pinheiro *et al.* (2009) para lectina de sementes de *Talisia esculenta* foi capaz de inibir o crescimento do fungo dermatófito *Microsporum canis*. Lectina isolada do cogumelo *Ganoderma lucidum* foi capaz de inibir os fungos patogênicos *Fusarium oxysporium*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus Niger*, *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton interdigitale*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis* (VINAY, SHIVAYOGESWAR e MADAPPA, 2011).

Efeito antifúngico pode ser exercido por lectinas vegetais e animais, algumas já foram descritas como a lectina vegetal de *Archidendron jiringa* Nielsen que foi capaz de promover atividade antifúngica contra *Exserohilum turcicum*, *Fusarium oxysporum* e de *Colletotrichum cassiicola* (CHARUNGCHITRAK *et al.*, 2011). Lam e Ng (2010), purificaram uma lectina de um cultivar francês de *Phaseolus vulgaris* capaz de inibir o crescimento do micélio de *Valsa mali*. Em outros estudos com lectinas animais podemos observar uma lectina animal de *Aplysia kurodai* que inibiu o crescimento do micélio de *Curvularia luneta* (KAWSAR *et al.*, 2010) e a lectina do marisco *Tegillarca granosa* inibiram o crescimento dos fungos *Saccharomyces carlsbergensis*, *Helminthosporium turcicum* e *Piricularia oryzae* (JIA-YING, YIN-SHAN e CONG-JIE, 2010).

A análise desenvolvida para observação da interação da CFAL com os fungos mostrou que esta lectina pôde interagir com a parede celular do fungo *Trichopyton rubrum* emitindo fluorescência apesar de não afetar o crescimento deste. Este resultado pode ser observado na Figura 14. A ação exercida pela lectina de *C. fairchildiana* mostra sua possível utilização em testes bioquímicos utilizando-a como marcador molecular.

A parede celular de fungos é composta por fibras de quitina, um polissacarídeo formado por unidades de *N*-acetilglicosamina (NELSON e COX, 2011). A interação de

CFAL à parede celular deste fungo é justificada por sua afinidade à coluna cromatográfica de quitina (dados não mostrados), em experimento realizado como estratégia de purificação.

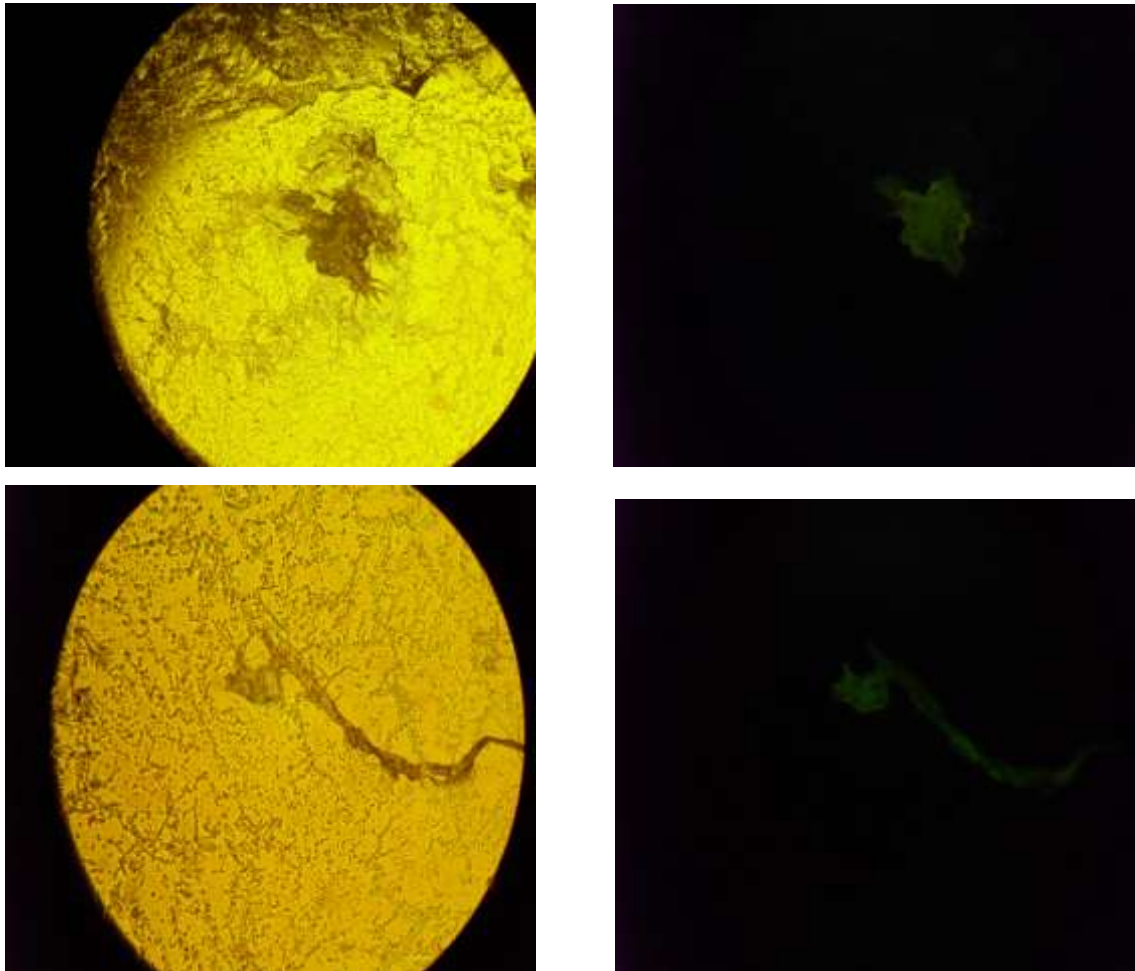


Figura 14 - Interação da CFAL marcada com FITC à parede celular do fungo *Trichopyton rubrum* observado em microscópio invertido.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As sementes de *C. fairchildiana* tem composição química formada principalmente de proteínas e lipídeos. Estas sementes são portadoras de uma lectina (CFAL), glicoproteína de peso molecular aparente de 116 kDa com ação antinociceptiva, através de um mecanismo periférico e ação antiinflamatória associada a um mecanismo de inibição de migração neutrofílica. Esta lectina também foi capaz de afetar o crescimento de *Bacillus subtilis* e interagiu com a parede celular do fungo *Trichopyton rubrum* indicando sua possível utilização como ferramenta para testes que necessitem de moléculas seletivas.

O efeito antiinflamatório da lectina de *C. fairchildiana* associado a não alteração de eritrócitos humanos, revela a importância de um possível uso desta no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de dor inflamatória.

O desafio agora é encontrar açúcares específicos que consigam interagir com o sítio de ligação a açúcares da lectina e uma vez identificado, desenvolver outras atividades biológicas e compreender seu mecanismo de ação. Sequenciar a proteína também é um desafio a ser enfrentado devido sua grande instabilidade e a deglicosilação da lectina pode ser um passo inicial para melhorar este impasse.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K. B. J.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**. v. 60, n. 1, p. 91-102, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Nota Técnica sobre produtos Biológicos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2012.

AGUIAR, A. C. F.; BICUDO, S. J.; SOBRINHO, J. R. S. C.; MARTINS, A. L. S.; COELHO, K. P. C.; MOURA, E. G. Nutrient recycling and physical indicators of an alley cropping system in a sandy loam soil in the pre-Amazon region of Brazil. **Nutr. Cycl. Agroecosyst.**, v. 86, p. 189–198, 2010.

ALENCAR, N. M. N.; CAVALCANTE, C. F.; VASCONCELOS, M. P; LEITE, K. B.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S.; NOGUEIRA, N. A. P; VALE, M. R. . Antiinflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, n. 7, p. 912-922, 2005.

ANAND, S. P.; DOSS, A.; NANDAGOPALAN, V. Antibacterial studies on leaves of *Clitoria ternatea* linn. – A high potential medicinal plant. **Int. J. Appl. Biol. Pharmaceut. Technol.**, v. 2, n. 3, p. 453-456, 2011.

ARAÚJO, F. M. M. C. **Caracterização bioquímica de sementes de cultivares de Caupí (*Vigna unguiculata* (L) Walp.** Fortaleza: UFC. 1997. 84p. Dissertação Mestrado

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 15. ed. Washington: 1990.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 17. ed. Washington: 2000.

ASSREUY, A. M. S.; ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S. ; ROCHA FILHO, D. R.; FEITOSA, R. F. G. ; CUNHA, F. Q. ; CALVETE, JUAN J ; RIBEIRO, ALBUQUERQUE, R. Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulate macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. **Biol Reprod.**, v. 68, n. 5, p. 1836-1841, 2003.

ASSREUY, A. M., FONTENELE, S. R., PIRES, A. F., FERNANDES, D. C., RODRIGUES, N. V., BEZERRA, E. H., MOURA. T. R., DO NASCIMENTO, K. S., CAVADA, B. S. Vasodilator effects of diocleinae lectins from the canavalia genus. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 380, n. 6, p. 509-21, 2009.

- AZEVEDO, A. R.; MORROS, J. F. G.; ALVES, A. A. Avaliação da composição química e parâmetros nutritivos de sementes de cunhã (*Clitoria ternatea* L.) **Ciê. Agron.**, v. 20, p. 73-78, 1989.
- BALZARINI, J. Large-molecular-weight carbohydrate-binding agents as HIV entry inhibitors targeting glycoprotein gp120. **Curr Opin HIV AIDS.**, v. 1, n. 5, p. 355-360, 2006.
- BALZARINI, J.; NEYTS, J.; SCHOLS, D.; HOSOYA, M.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W. E CLERCQ, E. The mannose-specific plant lectins from cymbidium hybrid and epipactis helleborine and the (*N*-acetylglucosamine)*n*-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. **Antiviral Res.**, v.18, p. 191–207, 1992.
- BANERJEE, S.; CHAKI, S.; BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B.P. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.421, p.125–134, 2004.
- BARAHONA, R.; SANCHEZ, S.; LASCANO, C. E.; OWEN, E.; MORRIS, P.; THEODOROU, M K. Effect of condensed tannins from tropical legumes on the activity of fibrolytic enzymes from the rumen fungus *Neocallimastix hurleyensis*. **Enzyme Microb Tech.**, v. 39, p. 281–288, 2006.
- BARAUNA, S. C. KASTER, M. P., HECKERT, B. T., DO NASCIMENTO, K. S., ROSSI, F. M., TEIXEIRA, E. H., CAVADA, B. S., RODRIGUES, A. L., LEAL, R. B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacol. Biochem. Behavior.**, v. 85, p. 160-169, 2006.
- BARBOSA, P.S.F.; MARTINS, A.M.C.; TOYAMA, M.H.; JOAZEIRO, P.P.; BERIAM, L.O.S.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.A.S. Purification and biological effects of a C-type lectin isolated from *Bothrops moojeni*. **J. Venom. Anim. Toxins.**, v. 16, p. 493–504, 2010.
- BARBOSA, T., ARRUDA, S., CAVADA, B., GRANGEIRO, T.B., FREITAS, L.A.R. & BARRAL-NETTO, M. In Vivo Lymphocyte Activation and Apoptosis by lectins of the Diocleinae Subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2001.
- BHOWAL, J.; GUHA, A.K. & CHATTERJEE, B.P. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydr. Res.**, v. 340, n. 12, p. 1973-1982, 2005.
- BIROC, S. L.; ETZLER, M. E. The effect of periodate oxidation and α -mannosidase treatment of *Dolichos biflorus*lectin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 544, n. 1, p. 85-92, 1978.
- BITENCOURT, F. S.; FIGUEIREDO, J. G.; MOTA, M. R. L.; BEZERRA, C. C. R.; SILVESTRE, P. P.; VALE, M. R.; NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, A. H.; NAGANO, C. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R. L.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. S. ALENCAR, N. M. N. Antinociceptive and anti-inflammatory

effects. of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, v. 377, p. 139–148, 2008.

BOLETI, A. P. A.; FREIRE, M. G. M.; COELHO, M. B.; SILVA, W.; BALDASSO, P. A.; GOMES, V. M.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. E MACEDO, M. L. R. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like **Propert. J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 7, p. 2653–2658, 2007.

BOLETI, A.P.A.; VENTURA, C.A.; JUSTO, G.Z.; SILVA, R.A.; SOUSA, A.C.T.; FERREIRA, C.V.; YANO, T.; MACEDO, M.L. Pouterin, a novel potential cytotoxic lectin-like protein with apoptosis-inducing activity in tumorigenic mammalian cells. **Toxicol.**, v. 51, p. 1321–1330, 2008.

BONINI, C. S. B. E ALVES, M.C. Recovery of soil physical properties by green manure, liming, gypsum and pasture and spontaneous native species. **R. Bras. Ciênc. Solo**, v. 35, p. 1397-1406, 2011.

BRADFORD, M. M. A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of dye binding. **Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução – RDC nº 40, de 21 de março de 2001. Regulamento técnico para rotulagem nutricional de alimentos e bebidas embaladas. Brasília, 2001.

BROOKS, S. A.; HALL, D. M. E BULEY, I. GalNAc glycoprotein expression by breast cell lines, primary breast cancer and normal breast epithelial membrane. **Br. J. Cancer.**, v. 85, n. 7, p. 1014-1022, 2001.

CAMARGO, T. M.; ALVES, M. I. F.; OLIVEIRA, S. J.; OSHIMA-FRANCO, Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MHb). **RBAC**, v. 39, p. 95-98, 2007.

CAVADA, B. S.; SANTI, T.; GADELHA, C. A. A.; GRANGEIRO, T. B.; ANDRADE NETO, M.; NUNES, E. P.; FRANCISCO RENATO GALVANI, F. R. Bases quimiotaxonômicas para diferenciação dos táxones *Acacia caven* (Mol.) Mol. e *Acacia farnesiana* (L.) Willdenow (leguminosae, mimosoideae). **Rev. FZVA.**, v. 2/3, n. 1, p. 1-10, 1996.

CHARAN, R. D.; MUNRO, M. H.; O'KEEFE, B. R.; SOWDER, R. C. I. I.; MCKEE, T. C.; CURRENS, M. J.; PANNELL, L. K.; BOYD, M. R. Isolation and characterization of *Myrianthus holstii* lectin, a potent HIV-1 inhibitory protein from the plant *Myrianthus holstii*(1). **J. Nat. Prod.**, v. 63, n.8, p. 1170-1174, 2000.

CHARUNGCHITRAK, S.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P.; KARNCHANATAT, A. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chem.**, v. 126, n. 3, p. 1025-1032, 2011.

COURA, C. O.; ARAÚJO, I. W. F.; VANDERLEI, E. S. O.; RODRIGUES, J. A. G.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; MENEZES, D. B.; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J. B.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria córnea*. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 110, n. 4, p. 335–341, 2012.

DHUNA, V.; BAINS, S. J.; KAMBOJ, S.S.; SINGH, J.; SHANMUGAVEL E SAXENA, A. K. Purification and characterization of a lectin from *arisaema tortuosum* schott having in-vitro anticancer activity against human cancer cell lines. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 38, n. 5, p. 526-532, 2005.

DOYLE, R. J. Introduction to lectins and their interactions with microorganisms. **In Lectin-microorganism Interactions**, p. 1–65, 1994.

DUTTA, S.; SINHA, B.; BHATTACHARYA, B.; CHATTERJEE, B.; MAZUMDER, S. Characterization of a galactose binding serum lectin from the Indian catfish, *Clarias batrachus*: Possible involvement of fish lectins in differential recognition of pathogens. **Comp. Biochem. Physiol. Part C**, v. 141, p. 76 – 84, 2005.

FARIA, R. A. G.; ANDRADE-NETO, M.; PINTO, L. S.; CASTELLÓN, R. R.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S. Caracterização química parcial e bioquímica de sementes de *Bauhinia forficata* link. **Arch. Lat. Nutr.**, v. 54, n. 3, p. 349-353, 2004.

FERREIRA, A. P.; CORRÊA, T.; CUNHA, R.; MARQUES, M. J.; MONTESANO, M. A.; SOUZA, M. A.; TEIXEIRA, H. C. Human serum antibody reactivity towards *Paracoccidioides brasiliensis* antigens treated with sodium metaperiodate. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, p. 325–329, 2008.

FIGUEIREDO, J. G.; BITENCOURT, F. S.; BESERRA, I. G.; TEIXEIRA, C.S.; LUZ, P. B.; BEZERRA, E. H. S.; MOTA, M. R. L.; ASSREUY, A. M. S.; CUNHA, F. Q.; CAVADA, B. S. *et al.* Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia bolivianaseeds* in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 380, n. 5, p. 407-414, 2009.

FIGUEIREDO, J. G.; BITENCOURT, F. S.; CUNHA, T. M. LUZ, P. B.; NASCIMENTO, K. S.; MOTA, M. R. L.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B. S.; CUNHA, F.; ALENCAR, N. M. N. Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces inflammatory hypernociception: Involvement of nitric oxide. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 96, n. 4, p. 371 – 377, 2010.

FREITAS, J. B. NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Rev. Nutr.**, v. 23, n.2, p. 269-279, 2010.

GADELHA, C. A., MORENO, F. B., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J. B., ROCHA, B. A., ASSREUY, A. M. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **J. Struct. Biol.**, v. 152, p. 185–194, 2005.

GAIDAMASHVILI, M. E STADEN, J. Lectin-like proteins from South African plant species used in tradicional medicine. **S. Afr. J. Bot.**, v. 68, p. 36-40, 2002.

GEBHARDT, R. In vitro screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. **Planta Med.**, v. 66, n. 2, p. 99-105, 2000.

GHOSH, M. Purification of a lectin-like antifungal protein from the medicinal herb, *Withania somnifera*. **Fitoterapia**. v. 80, n.2, p. 91-95, 2009.

GRIFFIS, C. A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biol. Res. Nurs.**, v. 7, n. 4, p. 297-312, 2006.

GRUPTA, R. K.; PANDEA, A. H.; GULLAA, K. C.; GABIUS, H. J.; HAJELA, K.; GUZMÁN-PARTIDA, A. M.; ROBLES-BURGUEÑO, M. R.; ORTEGA-NIEBLAS; M. E VÁZQUEZ-MORENO, I. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. **Biochimie.**, v. 86, p. 335–342, 2004.

HOLANDA, F. R.; COELHO-DE-SOUSA, A. N.; ASSREUY, A. M.S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; PIRES, A. F.; NASCIMENTO, K. S.; TEIXEIRA, C. S.; CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F. Antinociceptive activity of lectins from diocleinae seeds on acetic acid-induced writhing test in mice. **Protein Pept Lett.**, v. 16, n. 9, p. 1088-1092, 2009.

HUERRE, M. R.; GOUNON, P. Inflammation: patterns and new concepts. **Res Immunol.**, v. 147, n. 7, p. 417-34, 1996.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, 30,103-114, 1987.

INBAR, M. E SACHS, L. Mobility of carbohydrate-containing sites on the surface membranes in relation to control of cell growth. **FEBS Lett.** 32, 124–128, 1973.

ISLAM, B e KHAN, A. U. Lectins: To Combat Infections. **Protein Purif.** ISBN: 978-953-307-831-1.

ISLAM, B.; KHAN, S. N.; NAEEM, A.; SHARMA, V.; KHAN, A. U. Novel effect of plant lectins on the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on saliva-coated surface. **J. Appl. Microbiol.**, v. 106, n. 5, p. 1682-1689, 2009.

JAIN, N. N.; OHAL, C. C.; SHROFF, R. H.; SOMANI, R. S.; KASTURE, V. S.; KASTURE, S. B. *Clitoria ternatea* and the CNS. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 75, p. 529–536, 2003.

JEFFS, L. B.; XAVIER, I. J.; MATAI, R. E. e G. G. KHACHATOURIANS. Relationship between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the

genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Verticillium*. **Can. J. Microbiol.**, v. 45, p. 936-948, 1999.

JI, X.; CHEN, Y.; FARO, J.; GEWURZ, H.; BREMER, J.; SPEAR, G. T. Interaction of human immunodeficiency virus (HIV) glycans with lectins of the human immune system. **Curr Protein Pept Sci.**, v. 7, n. 4, p. 317-324, 2006.

JIA-YING, k.; YIN-SHAN, C.; CONG-JIE, D. The antibacterial activity and immunological properties of lectins from *Tegillarca granosa* Linnaeus. **Mar. Sci.**, 2010, DOI: CNKI:SUN:HYKX.0.2010-11-007.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

KABIR, S. R.; HOSSEN, A.; ZUBAIR, A.; ALOM, J.; ISLAM, F.; HOSSAIN, A.; YOSHINOBU, K. A new lectin from the tuberous rhizome of *kaempferia rotunda*: isolation, characterization, antibacterial and antiproliferative activities. **Protein Pept. Lett.**, v. 18, n. 11, p. 1140-1149, 2011.

KABIR, S. R.; ZUBAIR, M. A.; NURUJJAMAN, M.; HAQUE, M. A.; HASAN, I.; ISLAM, M. F.; HOSSAIN, M.T.; HOSSAIN, M. A.; RAKIB, M. A.; ALAM, M. T.; SHAHA, R. K.; HOSSAIN, M. T.; KIMURA, Y.; ABSAR, N. Purification and characterization of a Ca(2+)-dependent novel lectin from *Nymphaea nouchali* tuber with antiproliferative activities. **Biosci Rep.**, v. 31, n.6, p. 465-75, 2011.

KANNAN, S.; LAKKU, R. A.; NIRANJALI, D.; JAYAKUMAR, K.; STEVEN, A. H.; TARALAKSHMI, V. V.; CHANDRAMOHAN, S.; BALAKRISHNAN, R.; SCHMIDT, C E HALAGOWDER, D. Expression of peanut agglutinin-binding mucin-type glycoprotein in human esophageal squamous cell carcinoma as a marker. **Mol. Cancer.**, v. 2, n.38, 2003.

KARIM, A. A. E MANSOR, S. M. The free radical scavenging and antioxidant activities of pod and seed extract of *Clitoria fairchildiana* (Howard) - an underutilized legume. **J. Food Sci. Technol.**, 2010. DOI 10.1007/s13197-011-0370-8.

KATRE, U. V.; SURESH, C.G.; KHAN, M. I.; GAIKWAD, S. M. Structure–activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 42, p. 203–207, 2008.

KAWSAR, S. M. A.; MAMUN, S. M. A.; RAHMAN, S.; YASUMITSU, H. E OZEKI, Y. In Vitro Antibacterial and Antifungal Effects of a 30 kDa D-Galactoside-Specific Lectin from the Demosponge, *Halichondria okadai*. **Int. J. Biol. Life Sci.**, v. 6, n. 1, p. 31-37, 2010.

KELEMU, S.; CARDONA, C. SEGURA, G. Antimicrobial and insecticidal protein isolated from seeds of *Clitoria ternatea*, a tropical forage legume. **Plant Physiology and Biochemistry.**, v. 42, n. 11, p. 867 – 873, 2004.

- KONOZY, E. H. E.; BERNARDES, E. S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. Isolation, purification and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.410, p. 222-229, 2003.
- KUKU, A.; ODEKANYIN, O.; ADENIRAN, K.; ADEWUSI, M. E OLONADE, T. Purification of a mannose/glucose-specific lectin with antifungal activity from pepper seeds (*Capsicum annuum*). **Afr. J. Biochem. Res.**, v.3, n.6, p.272-278, 2009.
- KULINSKY, V.I. Biochemical aspects of inflammation. **Biochem.**, v. 72, p. 733–746, 2007.
- LAM, S. K.; NG, T.B. Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal, and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities and an exceptionally high yield. **Phytomed.**, v. 17, n. 6, p. 457-462, 2010.
- LI, Y. R.; LIU, Q. H.; WANG, H. X.; NG, T. B. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1780, p.51-57, 2008.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo : Plantarum, 1992. 197p.
- LORIS, R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT, J., WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochim. Biophys Acta.**, 1383, 9-36, 1998.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G. e MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2001. 366 p.
- MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v.146, p.486–498, 2007.
- MATHIAS, L.; MORS, W. B.; PARENTE, J. P. Rotenoids from seeds of *Clitoria fairchildiana*. **Phytochem.**, v. 48, n. 8, p. 1449 – 1451, 1998.
- MELZACK, R. The McGill pain questionnaire: major properties and scoring methods. **Pain**, v. 1, n. 3, p. 277- 279, 1975.
- MORENO, F. B. M. B. **Estudos estruturais de uma lectina presente em sementes de *Lotus tetragonolobus***. 2008. 126f. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2008.
- MOTA, M. R.L.; CRIDDLE, D. N.; ALENCAR, N. M.N.; GOMES, R. C.; MEIRELES, A.V. P.; SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A. A.; OLIVEIRA, C.

C.; BENEVIDES, R. G.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. S.. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 374, p. 1/16957941-10, 2006.

MUKHERJEE, P. K.; KUMAR, V.; KUMAR, N. S.; HEINRICH, M. The ayurvedic medicine *Clitoria ternatea*--from traditional use to scientific assessment. **J. Ethnopharmacol.**, v. 120, n.3, p. 291-301, 2008.

MUNOZ-CREGO, A.; ALVAREZ, O.; ALONSO, B.; ROGERS, D.J. & LVOVO, J. Lectin as diagnostic probes in clinical bacteriology-an overview. In **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry.**, v. 13, 1999.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica.** Trad. 5 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2006.

NAEEM, A.; SALEEMUDDIN, M. E KHAN, R. H. Compact acid-induced state of *Clitoria ternatea* agglutinin retains its biological activity. **Biochem.**, v. 74, n. 10, p. 1088-1095, 2009.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C. D.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extract and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz J Microbiol.**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NELSON, A. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de bioquímica.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

NEVES, S. A.; FREITAS, A.L.P.; SOUZA, B.W.S.; ROCHA, M.L.A.; CORREIA, M.V.O.; SAMPAIO, D.A. E VIANA, G.S.B. Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, n.1, p. 127-134, 2007.

NUNES, B. S.; RENSONNET, N. S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S. M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H.; MOURA, T. R.; TEIXEIRA, C. S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; CUNHA, F. Q.; NAPIMOGA, M. H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 379, n.6, p. 609-616, 2009.

NUNES, E. S.; SOUZA, M. A. A.; VAZ, A. F. M.; SANTANA, G. M. S.; GOMES, F. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, R. M. L.; SILVA-LUCCA, R. A.; OLIVA, M. L. V.; GUARNIERI, M. C.; CORREIA, M. T. S. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.**, v. 159, n. 1, p. 57-63, 2011.

OLIVEIRA, C. F. R.; LUZ, L. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochem.**, v. 46, n. 2, p. 498 – 504, 2011.

- OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. A. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; COELHO, L. C. B. B.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. & CORREIA, M. T. S. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.46, p.371-376, 2008.
- OLIVEIRA, T.J.; MELO, V.M.; CÂMARA, M.F.; VASCONCELOS, I.M.; BELTRAMINI, L.M.; MACHADO, O.L. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochem.**, v. 61, p. 301–310, 2002.
- OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAMIKI, A. Formalin-induced nociception activates a monoaminergic descending inhibitory system. **Brain Res.**, v. 814, p. 194–198, 1998.
- PANDE, A. H. SUMATI, HAJELA, N. HAJELA, K. Carbohydrate induced modulation of cell membrane VII. Binding of exogenous lectin increases osmofragility of erythrocytes. **FEBS Lett.**, n.427, p.21-24, 1998.
- PATIL, A. P.; PATIL, V. R. Comparative evaluation of *in vitro* antioxidant activity of root of blue and white flowered varieties of *Clitoria ternatea* Linn. **Int. J. Pharmacol.**, 2011. ISSN 1811-7775/ DOI: 10.3928/ijp.2011
- PATRICK, H. K. NGAI, T.B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 314, p. 988–993, 2004.
- PEREIRA, J. M. **Propedêutica das doenças dos cabelos e do couro cabeludo**, São Paulo : Atheneu Editora, 2001 - 248 p.
- PHARMACOGNOSTICAL, PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL REVIEW ON CLITORIA TERNATEA FOR ANTI-ASTHMATIC ACTIVITY. CHAUHAN, N.; RAJVAIDHYA, S. E DUBEY, B. K. **Int. J. Pharmaceut. Sci. Res.**, v. 3, n. 2, p. 398-404, 2012.
- PHILLIPSON, J. D.; ANDERSON, L. A. **J. Ethnopharmacol.**, v. 25, p.61, 1898.
- PINHEIRO, A. Q.; MELO, D. F.; MACEDO, L. M.; FREIRE, M. G. M.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; TEIXEIRA, E. H.; CAMPELLO, C. C.; PINHEIRO, D. C. S. N.; LIMA, M. G. S. Antifungal and marker effects of *Talisia esculenta* lectin on *Microsporum canis in vitro*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 107, n. 6, p. 2063–2069, 2009.
- PINTO, L. S.; ANDRADE-NETO, M.; BACARIN, M. A.; CASTELLÓN, R. R.; GADELHA, T.S.; GADELHA, C. A. E CAVADA, B. S. Caracterização química e bioquímica de sementes de *Bauhinia variegata* L. **Rev. Bras. Eng. Agríc Ambient.**, v.9, n.3, p.385-390, 2005.

POWELL, K.S.; SPENCE, J.; BHARATI, M.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Immunohistochemical and development studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stal.). **J. Insect Physiol.**, v.44, p.529–539, 1998.

PRAKASHKUMAR, R.; PUSHPANGADAN, P.; VIJAYAKUMAR, T. Search for lectins in seeds of tropical trees of Kerala, India. **Biol. Planta.**, v. 40, n. 1, p. 155-158, 1998.

RAIKHEL, N. V.; LEE, H.-I.; BROEKAERT, W. F. Structure and function of chitin-binding proteins. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 44, p. 591–615, 1993.

RAMOS, M. V.; BOMFIM, L. R.; BANDEIRA E DEBRAY, H. Evidências para um receptor endógeno da lectina em sementes de *Cratylia floribunda*. **Braz. J. Plant Physiol.**, v.14, n. 3, p. 195-202. ISSN 1677-0420, 2002.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J.C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon.**, v. 35, p. 305-309, 1997.

RAO, D.B.; KIRAN, C. R.; MADHAVI, Y.; RAO, P.K.; RAO, T.R. Evaluation of antioxidant potential of *Clitoria ternata* L. and *Eclipta prostrata* L. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 46 p. 247-252, 2009.

RASHEL KABIR, S.R.; HOSSEN, A.; ZUBAIR, A.; ALOM, J.; ISLAM, F.; HOSSAIN, A.; YOSHINOBU, K. A new lectin from the tuberous rhizome of *kaempferia rotunda*: Isolation, characterization, antibacterial and antiproliferative activities. **Protein Pept. Lett.**, v. 18, n.11, p. 1140-1149, 2011.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mater Res.**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

RUDIGER, H. E GABIUS, H. J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate J.**, v.18, p.589–613, 2001.

SÁ, R. A.; SANTOS, N. D.; SILVA, C. S.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; CAVADA, B. S.; COELHO, L. C.; NAVARRO, D. M.; BIEBER, L. W. E PAIVA, P. M. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v. 149, n. 3, p. 300-306, 2009.

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A.A.; ARAGÃO, K. S.; OLIVEIRA, C. C.; MOTA, M.R.L.; GOMES, R. C.; PIRES, A. F.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; ALENCAR, N. M.N. ; CRIDDLE, D. N. ; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. S. . Purification and Biological Effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) Seed Lectin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 350, p. 1050/17045568-1055, 2006.

SANTI-GADELHA, T.; ROCHA, B.A.M.; OLIVEIRA, C.C.; ARAGÃO, K.S.; MARINHO, E.S.; GADELHA, C.A.A.; TOYAMA, M.H.; PINTO, V.P.T.; NAGANO, C.S.; DELATORRE, P.; MARTINS, J. L.; GALVANI, F. R.; SAMPAIO, A. H.;

DEBRAY, H.; CAVADA, B. S. Purification of a PHA-like chitin binding lectin from *Acacia farnesiana* seeds: A time-dependent oligomerization protein. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 150, p. 97–111, 2008.

SANTODOMINGO-GARZÓN, T.; CUNHA, T.M.; VERRI, W.A., JR.; VALÉRIO, D.A.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Atorvastatin inhibits inflammatory hypernociception. **Br. J. Pharmacol.**, v. 149, p. 14–22, 2006.

SANTOS, A. P.; GOMES, P. T. T.; ANTUNES, L. B. B.; RAMILO, V. M. P.; ALMEIDA, J. M.; RIGO, M.; SANTA, O. R. D. Farinha de Feijão (*Phaseolus vulgaris*): Caracterização Química e Aplicação em Torta de Legumes. **Rev. Ciên. Exatas e Naturais**, v. 11, n. 2, 2009.

SANTOS-FILHO, S. D.; BERNARDO-FILHO, M. Evaluation of consequences of the treatment of blood with extracts of *Hypericum perforatum* and *Mentha crispata*. **Med. Chem. Res.**, v. 18, n. 7, p. 545-554, DOI: 10.1007/s00044-008-9148-6, 2009.

SCALON S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; SCALON FILHO, H.; FRANCELINO, C. S. F. Desenvolvimento de mudas de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e sombreiro (*Clitoria fairchildiana*) sob condições de sombreamento. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 166-169, 2006.

SHARON N & LIS H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology.**, v.14, n.11, p.53-62, 2004.

SILVA, B. M. S.; CARVALHO, N. M. Efeitos do estresse hídrico sobre o desempenho germinativo da semente de faveira (*Clitoria fairchildiana* R.A. Howard. – Fabaceae) de diferentes tamanhos. **Rev. Bras. Sementes**, v. 30, n. 1, p. 55-65, 2008.

SILVA, B. P. e PARENTE, J. P. Antiinflammatory activity of rotenoids from *Clitoria fairchildiana*. **Phytother. Res.**, v. 16, p. 87–88, 2002.

SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J.P. Rotenoids from roots of *Clitoria fairchildiana*. **Phytochem.**, v. 49, n. 6, p. 1787–1789, 1998.

SILVA, L. M.; LIMA, V.; HOLANDA, M. L.; PINHEIRO, P. G.; RODRIGUES, J. A.; LIMA, M. E.; BENEVIDES, N. M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 33, n. 5, p. 830-835, 2010.

SILVEIRA, S. B. **Purificação e caracterização de uma lectina da fração das glutelinas ácidas da semente de *Acacia farnesiana* (L.) Wild.** 2005. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

SOUZA, G. E.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.

SOUZA, G.E.; CUNHA, F.Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S.H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions**, v. 24, p. 377–380, 1988.

SOUZA, J.D.; SILVA, M.B.R.; ARGOLO, A.C.C.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S.; PAIVA, P.M.G.; SILVA, M.D.C.; COELHO, L.C.B.B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **Int. Biodeter. Biodegr.**, v. 65, p. 696–702, 2011.

STONE, K. L.; BJORNSON, R. D. B.; BLASKO, G. G.; BRUCE, C. COFRANCESCO, R.; CARRIERO, N. J.; COLANGELO, M. C.; CRAWFORD, J. K.; CRAWFORD, J. M.; SILVA, N. C.; DELUCA, J. D.; ELLIOTT, J. I.; ELLIOTT, M. M.; FLORY, P. J.; FOLTA-STOGNIEW, E. J.; GULCICEK, E.; KONG, Y.; LAM, T. T.; LEE, J. Y.; LIN, A.; LOPRESTI, M. B.; MANE, S. M.; MCMURRAY, W. J.; TIKHONOVA, I. R.; WESTMAN, S.; WILLIAMS, N. A.; WU, T. L.; HONGYU, Z. E WILLIAMS, K. R. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory, **Yale J. Biol. Med.**, v. 80, n. 4, p. 195–211, 2007.

SULTAN, N. A. M.; KAVITHA, M.; SWAMY, M. J. Purification and physicochemical characterization of two galactose-specific isolectins from the seeds of *Trichosanthes cordata*. **IUBMB Life**, v. 61, n. 4, p. 457–469, 2009.

TEIXEIRA, M. J. **A lesão do trato de Lissauer e do corno posterior da substância cinzenta da medula espinal e a estimulação elétrica do sistema nervoso central para o tratamento da dor por desafferentação**. São Paulo, 1990. Tese (Doutorado), São Paulo Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 256 p.

TERADA, T.; WATANABE, Y.; TATENO, H.; NAGANUMA, T.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Structural characterization of a rhamnose-binding glycoprotein (lectin) from Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) eggs. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1770, n. 4, p. 617–629, 2007.

TREVISAN, H.; NADAI, J.; LUNZ A. M.; CARVALHO, A. G. Consumo foliar e aspectos biológicos de *Urbanus acawoios* (Lep.: Hesperidae) alimentado com folíolos de *Clitoria fairchildiana* (Leguminosae: Faboideae) em três níveis de maturidade. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, 2004.

TURTON, K.; NATESH, R.; THIYAGARAJAN, N.; CHADDOCK, J. A. E ACHARYA, K. R. Crystal structures of *Erythrina cristagalli* lectin with bound *N*-linked oligosaccharide and lactose. **Glycobiol.**, v. 14, n. 10, p. 923-929, 2004.

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN). Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?314023>. Acesso em: 27 de Fevereiro de 2012.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Plant Sci.**, v.17, n.6, p.575-692, 1998.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W. F. E PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta** v. 183, 258-264, 1991.

VANDERLEI, E. S. O.; PATOILLO, K. K. N. R.; LIMA, N. A.; LIMA, A.P.S.; RODRIGUES, J. A. G.; SILVA, L. M. C. M.; LIMA, M. E. P.; LIMA, V.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **Int. Immunopharmacol.**, v. 10, n. 9, p. 1113-1118, 2010.

VINAY, U. G.; SHIVAYOGESWAR, N.; MADAPPA, K. *Ganoderma lucidum*: A Source for Novel Bioactive Lectin. **Protein Pept Lett.**, 18, n. 11, p. 1150-1157, 2011.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. **J. Pharmacol.**, v. 166, p. 95-103, 1969.

VIROUNBOUNYAPAT, P.; KARNCHANATAT, A. E SANGVANICH, P. An alpha-glucosidase inhibitory activity of thermostable lectin protein from *Archidendron jiringa* Nielsen seeds. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 11, n. 42, p.10026-10040, 2012.

VITOR, A. O.; PONTE, E. L.; SOARES, P. M.; RODRIGUES, M. E. S.; LIMA, R. C. S.; CARVALHO, K. M.; PATROCÍNIO, M. C. A.; VASCONCELOS, S. M. M. Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica. **Rev. Eletr. Com. Inf. Inov. Saúde**. Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 87-96, 2008.

WILHELM, D.L. The mediation of increased vascular permeability in inflammation. **Pharmacol. Rev.**, v. 14, p. 251-280, 1962.

YUWA-AMORNPITAK, T.; KOGUCHI, M. E TERAMOTO, Y. Antioxidant Activity of Herbal Wine Made from Cassava Starch. **World Appl. Sci. J.**, v. 16, n. 6, p. 874-878, 2012.

ZANETTI, G. D. **Lectina dos rizomas de *Arundo donax* L.: Purificação, caracterização, propriedades, imuno-histoquímica e separação das isoformas.** 2007. (Doutorado em Ciências Biológicas – Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

ZATTA, P. F.; CUMMINGS, R. Lectins and their uses as biotechnological tools. **Biochem. Education**. v. 20, n. 1, p. 2-9, 1992.

ZEILHOFER, H. U. Synaptic modulation in pain pathways. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 154, p. 73-100, 2005.

ZHAO, J. K.; ZHAO, Y. C.; LI, S. H.; WANG, H. X.; NG, T. B. Isolation and characterization of a novel thermostable lectin from the wild edible mushroom *Agaricus arvensis*. **J. Basic Microbiol.**, v. 51, n. 3, p. 304-311, 2011.

ZHU-SALZMAN, K.; HAMMENB, P. K.; SALZMAN, R. A.; KOIWAD, H.; BRESSAND, R.; MURDOCKE, L. L.; HASEGAWAD, P. M. Calcium modulates

protease resistance and carbohydrate binding of a plant defense legume lectin, *Griffonia simplicifolia* lectin II (GSII). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 132, p. 327–334, 2002.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Resumos e trabalhos desenvolvidos durante o doutorado

LEITE, Joana Filomena Magalhães, ASSREUY, Ana Maria Sampaio, Mota, Mário Rogério Lima, BRINGEL, Pedro Henrique de Souza Ferreira, e Lacerda, Rodrigo Rodrigues, GOMES, Vinícius de Moraes, Cajazeiras, João Batista, do Nascimento, Kyria Santiago, Pessôa, Hilzeth de Luna Freire, GADELHA, Carlos Alberto de Almeida, Delatorre, Plinio, CAVADA, Benildo Sousa, Santi-Gadelha, Tatiane Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of a Lectin-Like Substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard Seeds. *Molecules* (Basel. Online). , v.17, p.3277 - 3290, 2012.

LACERDA, Rodrigo Rodrigues e, LEITE, Joana Filomena Magalhães, GOMES, Vinícius de Moraes, CALUÊTE, Maria Emília Evaristo, CUNHA, Fernando de Queiroz, FIGUEIREDO, Jozi Godoy, GADELHA, Tatiane Santi. *Acacia farnesiana* (L) Willd. (Mimosoideae) Lectinlike Decreases Neutrophil Migration and Vascular Permeability in vivo In: 23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2011, João Pessoa. **23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis.** , 2011.

CALUÊTE, Maria Emília Evaristo, GOMES, Vinícius de Moraes, LACERDA, Rodrigo Rodrigues e, LEITE, Joana Filomena Magalhães, PESSOA, Hilzeth de Luna Freire, GADELHA, Carlos Alberto de Almeida, GADELHA, Tatiane Santi. Assessment Activity of Plant Lectins on the Development of Pathogenic and Non Pathogenic Bacteria In: 23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2011, João Pessoa. **23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis.** , 2011.

LEITE, Joana Filomena Magalhães, LACERDA, Rodrigo Rodrigues e, GOMES, Vinícius de Moraes, CALUÊTE, Maria Emília Evaristo, GADELHA, Carlos Alberto de Almeida, BRINGEL, Pedro Henrique de Souza Ferreira, ASSREUY, Ana Maria Sampaio, GADELHA, Tatiane Santi, CAVADA, Benildo Sousa. Effect of *Clitoria fairchildiana* Lectin in Models of Nociception Induced by Acetic Acid In: 23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2011, João Pessoa. **23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis.** , 2011.

GOMES, Vinícius de Moraes, LEITE, Joana Filomena Magalhães, LACERDA, Rodrigo Rodrigues e, FIGUEIREDO, Jozi Godoy, CALUÊTE, Maria Emília Evaristo, CUNHA, Fernando de Queiroz, GADELHA, Carlos Alberto de Almeida, GADELHA, Tatiane Santi. The antiinflammatory potencial of *Abelmoschus esculentus* seed lectin in mice In: 23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2011, João Pessoa. **23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis.** , 2011.

LACERDA, Rodrigo Rodrigues e, TRINDADE, Arthur de Sousa Pereira, Leite, Maria Clerya Alvino, LEITE, Joana Filomena Magalhães, GADELHA, Carlos Alberto de Almeida, PESSOA, Hilzeth de Luna Freire, GADELHA, Tatiane Santi. Atividade

Antibacteriana e hemolítica da lectina das sementes de *Mucuna pruriens* (L) DC In: XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010, João Pessoa. **Plantas Medicinais do Brasil.**, 2010.

ABRANTES, Vanessa Erika Ferreira Abrantes, GOMES, Vinícius de Moraes, LACERDA, Rodrigo Rodrigues e, Leite, Maria Clerya Alvino, LEITE, Joana Filomena Magalhães, GADELHA, Tatiane Santi, GADELHA, Carlos Alberto de Almeida. Atividade Hemaglutinante das frações albumina, globulina e glutelina ácida extraídas de sementes de *Sterculia foetida* L. (Malvaceae) In: XXXIII Reunião Nordestina de Botânica, 2010, Aracajú. **XXXIII Reunião Nordestina de Botânica. Flora Nordestina: Diversidade, Conhecimento e Conservação.**, 2010.

Leite, Maria Clerya Alvino, GOMES, Vinícius de Moraes, LEITE, Joana Filomena Magalhães, ALBUQUERQUE, Carolina Leal de, COSTA, Maria José de Carvalho, GADELHA, Carlos Alberto de Almeida, GADELHA, Tatiane Santi. Detecção de atividade hemaglutinante e atividade hemolítica em folhas de cenoura (*Daucus carota* L.) In: XXXIII Reunião Nordestina de Botânica, 2010, Aracajú. **XXXIII Reunião Nordestina de Botânica. Flora Nordestina: Diversidade Conhecimento e Conservação.**, 2010.

LEITE, Joana Filomena Magalhães, Leite, Maria Clerya Alvino, LACERDA, Rodrigo Rodrigues e, GADELHA, Carlos Alberto de Almeida, GADELHA, Tatiane Santi, CAVADA, Benildo Sousa. Efeito de agentes oxidante, desnaturante, quelante e enzimas proteolíticas frente à lectina de sementes de *Clitoria fairchildiana* In: XXI simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010, João Pessoa. **Plantas Medicinais do Brasil.**, 2010.

LACERDA, Rodrigo Rodrigues e, LEITE, Joana Filomena Magalhães, GADELHA, Carlos Alberto de Almeida, GADELHA, Tatiane Santi. Estudo das propriedades físico-químicas da lectina das sementes de *Mucuna pruriens* (L) DC In: XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010, João Pessoa. **Plantas Medicinais do Brasil.**, 2010.

Leite, Maria Clerya Alvino, GOMES, Vinícius de Moraes, LEITE, Joana Filomena Magalhães, LACERDA, Rodrigo Rodrigues e, GADELHA, Carlos Alberto de Almeida, COSTA, Maria José de Carvalho, GADELHA, Tatiane Santi. Estudos da integridade da lectina de folha de cenoura (*Daucus carota* L.) frente a diferentes agentes In: XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010, João Pessoa. **Plantas Medicinais do Brasil.**, 2010.

ALBUQUERQUE, Carolina Leal de, LEITE, Joana Filomena Magalhães, Leite, Maria Clerya Alvino, MIRANDA, George Emmanuel Cavalcanti de, GADELHA, Tatiane Santi, GADELHA, Carlos Alberto de Almeida. Levantamento de Atividade em Algas Marinhas do Litoral Paraibano: Caracterização bioquímica, físico-química e aplicação biológica In: XXXIII Reunião Nordestina de Botânica, 2010, Aracajú. **Flora Nordestina: Diversidade, Conhecimento e Conservação.**, 2010.

LACERDA, Rodrigo Rodrigues e, LEITE, Joana Filomena Magalhães, GOMES, Vinícius de Moraes, GADELHA, Carlos Alberto de Almeida, GADELHA, Tatiane Santi. Purificação e Caracterização de uma lectina presente nas sementes de *Mucuna*

pruriens (L) DC (Leguminosae) In: XXXIII Reunião Nordestina de Botânica, 2010, Aracajú. **Flora Nordestina: Diversidade, Conhecimento e Conservação.**, 2010.

LEITE, Joana Filomena Magalhães, LACERDA, Rodrigo Rodrigues e, Leite, Maria Clerya Alvino, ALBUQUERQUE, Carolina Leal de, GADELHA, Carlos Alberto de Almeida, GADELHA, Tatiane Santi, CAVADA, Benildo Sousa. Purificação parcial de uma lectina de sementes de *Clitoria fairchildiana* R. Howard In: XXXIII Reunião Nordestina de Botânica, 2010, Aracajú. **Flora Nordestina: Diversidade, Conhecimento e Conservação.**, 2010.

LACERDA, Rodrigo Rodrigues e, LEITE, Joana Filomena Magalhães, Leite, Maria Clerya Alvino, GOMES, Vinícius de Moraes, ABRANTES, Vanessa Erika Ferreira Abrantes, GADELHA, Carlos Alberto de Almeida, GADELHA, Tatiane Santi Purificação parcial de uma lectina de *Talinum fruticosum* (L) Juss (Portulacaceae) In: XXXIII Reunião Nordestina de Botânica, 2010, Aracajú. **Flora Nordestina: Diversidade, Conhecimento e Conservação.**, 2010.

MENDONÇA, Luciana Gama de, BARROSO-NETO, Ito Liberato, LEITE, Joana Filomena Magalhães, NASCIMENTO, Antônia Sâmia Fernandes do, MARINHO, Emmanuel Silva, CAVADA, Benildo Sousa. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LECTÍNICO DE EXTRATOS PROTÉICOS DE SEMENTES DE AZADIRACHTA INDICA A. JUSS In: **XXVIII Encontro de Iniciação Científica**, 2009, Fortaleza.