



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

MIRELLA LEITE PEREIRA

IDENTIFICAÇÃO DE UMA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA EM
SEMENTES DE *Moringa oleifera* Lamarck COM ATIVIDADES
ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA

FORTALEZA – CEARÁ
2010

MIRELLA LEITE PEREIRA

IDENTIFICAÇÃO DE UMA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA EM SEMENTES DE
Moringa oleifera Lamarck COM ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-
INFLAMATÓRIA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientadora: Dra. Ilka Maria Vasconcelos

Co-orientador: Dr. Hermógenes David de Oliveira

FORTALEZA – CEARÁ
2010

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PEQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Catálogo e publicação na Biblioteca Setorial de Ciências e Tecnologia, Campus
do Pici, Universidade Federal do Ceará.

P493i Pereira, Mirella Leite

Identificação de uma proteína ligante à quitina em sementes de
Moringa Oleifera Lamarck com atividades antinociceptiva e anti-
inflamatória / Mirella Leite Pereira, 2010.

142 f. ;il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dr. Ilka Maria Vasconcelos

Co-orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Ciências, Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2010.

1. Glicoproteína. 2. Quitina. 3. Atividade antinociceptiva. 4. Atividade
anti-inflamatória. I. Vasconcelos, Ilka Maria (Orient.). II. Oliveira,
Hermógenes David de (Co-orient.). III. Universidade Federal do Ceará –
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDD 574.192

MIRELLA LEITE PEREIRA

IDENTIFICAÇÃO DE UMA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA EM SEMENTES DE
Moringa oleifera Lamarck COM ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-
INFLAMATÓRIA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Tese aprovada em: 16 de março de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará
(Orientadora)

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira
Universidade Federal do Ceará
(Co-orientador)

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza

FORTALEZA – CEARÁ
2010

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por ter me concedido a vida e por sempre despertar em mim o desejo de lutar e ultrapassar todas as barreiras.

Aos meus pais, **Angela Maria** e **José Luíz**, por me ensinarem a viver a vida com dignidade. O amor e apoio de vocês foram essenciais para chegar aonde cheguei.

Aos meus irmãos, **Mariangela**, **Larissa** e **Josmar**, por terem sustentado comigo os problemas deixando-os mais leves. Pelas risadas e pelas brigas também, porque irmão é assim mesmo.

Ao meu amorzão, **Rubinho**, que me apoiou nos bons e nos maus momentos e me acalmou quando estava em níveis exorbitantes de estresse, sempre me dando muito carinho e amor. Eu te amo muito!

Aos meus cunhados amados, **Carminha** e **Breno**, pelos momentos de alegria e por sempre estarem presentes nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos, que graças à Deus não são poucos. Em especial à “Sociedade do Anel”: **Natália**, **Sara** e **Érika**, por serem perseverantes na amizade, aceitando minha ausência durante esta jornada.

À minha orientadora e mãe científica, **Ilka Maria Vasconcelos**, por ter me acolhido em seu laboratório e por ter sido uma brilhante professora e amiga durante esses quase cinco anos de convivência. Agradeço pela paciência e por sempre acreditar em mim.

Ao meu co-orientador científico e orientador da vida, **Hermógenes David de Oliveira**, que me ajudou muito nesse trabalho. Por ter sido meu grande amigo. Por ter me apoiado em todas as horas desde que o conheci. Por sempre acreditar no meu potencial e abrir meus olhos quando estava errada. Pelas risadas de tirar o fôlego e derramar lágrimas. Por ser um exemplo de vida.

Aos meus amigos da Família LABTOX: (por ordem alfabética para não dar briga) **Adelina Braga**, pelas palavras (que nunca são poucas) de apoio; **Daniel Câmara**, pela paciência e amizade; **Daniele Oliveira**, pelo incentivo e pelas milhares risadas; **Handerson Ribeiro**, que conquistou meu respeito e amizade; **Helen Paula**, pelas boas risadas; **Henrique Pinho**, pela beleza tanto exterior como interior, pela amizade sinceridade e apoio; **Janne Keila**, por sempre me

ajudar em qualquer coisa que eu faça e por ser uma grande amiga; **Mariana Reis**, pela excelente convivência; **Raquel Rocha**, por ter sido minha amiga, companheira de experimentos e um exemplo de competência.

Aos companheiros que passaram pelo LABTOX: **Andréa, Silvinha, Juliana e Geórgia**, pela maravilhosa convivência.

Aos amigos do **DBBM**: **Adilton, Martônio, Bruno, Ito, Tales, Helton, Nathana, Lady, Davi Farias, Thiago, Cléverson, Camila, Gabriela, Mariana, Edfrank, Luana** e muitos outros, que de uma maneira ou de outra deram suas colaborações.

Aos grandes amigos e parceiros do Laboratório de Proteínas de Defesa Vegetal representados aqui pela **Darcy, Fredy e Hélio**, pela colaboração sempre constante, apoio sem compromisso e pela amizade conquistada.

Aos professores do **DBBM**, especialmente representados pelos professores **José Tadeu, Dirce Fernandes, Enéas Gomes e Joaquim Albenísio** pelos ensinamentos transmitidos e pelas amizades.

Aos meus avós, **Leopoldina e José Leite**, por todo amor e experiência de vida transmitida.

Aos meus tios, em especial, tia **Neile** por estar sempre presente em minha vida. À tia **Goretti** por ser um exemplo acadêmico em nossa família. Aos primos, **Marcellus e Karla Roberta**, por sempre estarem presentes em momentos importantes. À todos os meus familiares.

MUITO OBRIGADA!

Os trabalhos experimentais que compõem esta tese foram realizados com o apoio das seguintes instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas em parceria com o **Laboratório de Toxinas Vegetais- LABTOX**, sob coordenação e orientação da Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) e **FUNDAÇÃO CEARENSE DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (FUNCAP)** - através da concessão de bolsa de Pós-Graduação à autora deste trabalho.

DEMAIS INSTITUIÇÕES DE FOMENTO E APOIO À PESQUISA COMO: CNPq e FCPC (UFC) que contribuem para a melhoria nas condições experimentais e na formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

“Tudo o que você precisa é de amor!”

Lennon & McCartney

RESUMO

PEREIRA, M.L. **Identificação de Uma Proteína Ligante à Quitina em Sementes de *Moringa oleifera* Lamarck com Atividades Antinociceptiva e Anti-inflamatória.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

Moringa oleifera Lam. é uma árvore conhecida pelo seu valor medicinal, uma vez que extratos de todas as partes desta planta mostraram propriedades farmacológicas reconhecidas pelo uso popular e corroboradas pela comunidade científica. Dentre as atividades farmacológicas, destacam-se àquelas relacionadas a processos inflamatórios. Este trabalho teve como objetivo o isolamento e caracterização de uma proteína ligante à quitina de sementes de *Moringa oleifera* e avaliação de suas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória. As proteínas foram extraídas da farinha delipídada de sementes e o extrato total foi fracionado em albuminas e globulinas. A fração albumínica foi submetida à cromatografia de afinidade em matriz de quitina. A fração ligante à quitina eluída com *N*-acetil-*D*-glucosamina 0,1 M foi submetida à cromatografia de troca iônica acoplada a um sistema de FPLC, rendendo cinco picos protéicos. O material eluído com tampão acetato de sódio 0,5 M, pH 5,2, contendo NaCl 0,6 M, denominado *Mo*-CBP₄ (*Mo* – *Moringa oleifera*; “CBP – “chitin binding protein”), teve um rendimento final de 0,54% e foi escolhido para dar continuidade ao trabalho. *Mo*-CBP₄ apresentou-se como duas bandas protéicas de massas moleculares aparentes de 27,5 e 16,5 kDa, em condições não-redutoras, e de 9,8 kDa em condições redutoras. Eletroforese bidimensional desta proteína revelou a presença de dois spots (18,7 e 13,4 kDa), com mesmo ponto isoelétrico (pI de 10,55). Trata-se de uma glicoproteína com 2,85% de carboidratos, não apresentando atividade hemaglutinante. *Mo*-CBP₄ mostrou-se tão eficiente quanto o sulfato de alumínio e potássio na capacidade de coagular material em suspensão na água. A proteína em questão foi resistente à proteólise no teste de digestibilidade *in vitro* utilizando pepsina, tripsina e quimotripsina. Para avaliar os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório de *Mo*-CBP₄, foi utilizado o modelo de contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético 0,8% (via i.p.) em camundongos. A proteína, nas doses de 1,0, 3,5 e 10 mg/kg, foi capaz de prevenir as contorções de maneira dose dependente, chegando a 98,9% de inibição na dose de 10 mg/kg. *Mo*-CBP₄ também apresentou atividade antinociceptiva por via oral (10 mg/kg), atingindo uma inibição de 52,9% quando administrada 60 minutos antes da injeção de ácido acético. *Mo*-CBP₄ inibiu o aumento da permeabilidade vascular (89,1%) e a migração leucocitária (60,9%) na dose de 10 mg/kg via i.p. A propriedade antinociceptiva parece ser independente do sítio de interação ao carboidrato *N*-acetil-*D*-glucosamina, enquanto que a atividade anti-inflamatória mostrou um decréscimo quando a região de ligação ao carboidrato foi bloqueada. Os resultados apresentados suportam cientificamente o uso popular da *M. oleifera* e mostram que uma proteína ligante à quitina, *Mo*-CBP₄, está associada aos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório das sementes.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*; proteínas ligantes à quitina; atividade antinociceptiva; atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT

PEREIRA, M.L. **Identification of a Chitin-Binding Protein from *Moringa oleifera* Lamarck Seeds with antinociceptive and anti-inflammatory effects.** Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

Moringa oleifera Lam. is a perennial multipurpose tree with a strong scientific evidence of its curative power and used in folk medicine to cure several inflammatory processes. This work aimed to isolate and characterize a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, and evaluate its antinociceptive and anti-inflammatory effects. Chitin-binding proteins were obtained after application of albumin fraction from crude extract of *M. oleifera* seeds into a chitin column and the adsorbed fraction was applied in a Resource-S matrix attached to FPLC system. The fraction eluted with 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.2, containing 0.6 M NaCl, named *Mo*-CBP₄ was used for the experiment. *Mo*-CBP₄ showed a single band on SDS-PAGE (molecular mass 9.8 kDa) in presence of reducing agent, however in the absence of 2-mercaptoethanol two bands corresponding to 27.5 and 16.5 kDa were observed. Bidimensional electrophoresis of this protein revealed the presence of two spots (18.7 and 13.4 kDa), with the same isoelectric point value corresponding to 10.55. *Mo*-CBP₄ is a glycoprotein containing 2.85% neutral sugar, which failed to agglutinate untreated or trypsin-treated erythrocytes from rabbit or human origin. This protein showed coagulant activity, similar to aluminum and potassium sulfate, the coagulant most widely used in water treatment. *Mo*-CBP₄ was subjected to in vitro digestion with pepsin, trypsin, or chymotrypsin and appeared to be markedly resistant to digestion. Acetic acid-induced abdominal constrictions, increase in vascular permeability and leukocyte migration tests were used for the antinociceptive and anti-inflammatory activities assessment. *Mo*-CBP₄ (1.0, 3.5 and 10 mg/kg) into mice potently and significantly reduced the occurrence of abdominal writhing in a dose dependent manner by 18.9, 44.6% and 98.9%, respectively. In addition, the oral administration of the protein (10 mg/kg) resulted in 18% and 52.9% reductions in abdominal writhing when given 30 and 60 min prior to acetic acid administration, respectively. *Mo*-CBP₄ also caused a significant and dose-dependent inhibition of peritoneal capillary permeability induced by acid acetic and significantly inhibited leukocyte accumulation in the peritoneal cavity. The effect antinociceptive appeared to be independent on the carbohydrate recognition site. However the anti-inflammatory activity was partially reversed when *Mo*-CBP₄ was pre-incubated with specific carbohydrate ligand, showing that this effect is dependent on the carbohydrate recognition site.

Keywords: *Moringa oleifera*; chitin-binding protein; protein purification; antinociceptive effect; anti-inflammatory activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

AaL	<i>Araucaria angustifolia lectin</i> (lectina de <i>Araucaria angustifolia</i>)
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CboL	<i>Canavalia boliviana lectin</i> (lectina de <i>Canavalia boliviana</i>)
CMoL	<i>Coagulant M. oleifera lectin</i> (lectina coagulante de <i>M. oleifera</i>)
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COX	Ciclooxigenase
DAINEs	Drogas anti-inflamatórias não esteroidais
DSA	<i>Datura stramonium agglutinin</i> (aglutinina de <i>Datura stramonium</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDRFs	Fatores de relaxamento vascular derivados do endotélio
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GlycNac	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina
HCA	<i>Hypnea cercornis agglutinin</i> (aglutinina de <i>Hypnea cercornis</i>)
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HETE	Ácido hidroxicicosatetraenóico
i.p	Intraperitoneal
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LCc	<i>Caulerpa cupressoides lectin</i> (lectina de <i>Caulerpa cupressoides</i>)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LT	Leucotrieno

Mo-CBP	<i>M. oleifera - chitin-binding protein</i> (proteína ligante à quitina de <i>M. oleifera</i>)
MoL	<i>M. oleifera</i> lectin (lectina de <i>M. oleifera</i>)
NO	Óxido nítrico
NTU	<i>Nephelometric turbidity unit</i> (unidade nefelométrica de turbidez)
P_{AC}	Pico eluído com ácido acético
PAF	Fator ativador de plaquetas
PG	Prostaglandina
PMN	Polimorfonucleares
P_{NAG}	Pico eluído com GlycNac
PR	Proteínas relacionadas à patogênese
RIP	Proteínas inativadoras de ribossomos
SAP	Sulfato de alumínio e potássio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletenodiamino
TNF	Fator de necrose tumoral
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UDA	<i>Urtica dioica agglutinin</i> (aglutinina de <i>Urtica dioica</i>)
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
v.o	Via oral
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i> (aglutinina de germen de trigo)
WHO	<i>World Health organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
01	<i>Moringa oleifera</i> Lamarck.	21
02	Associação entre os países que têm maior índice de desnutrição e aqueles onde a <i>Moringa</i> cresce.	24
03	Etapas do processo de migração leucocitária dos vasos sanguíneos para o local da inflamação.	33
04	Esquema de obtenção do extrato total a partir de sementes de <i>Moringa oleifera</i> , segundo Gifoni (2005).	46
05	Esquema geral de purificação das proteínas ligantes a quitina (<i>MoCBP</i> ₁ – <i>MoCBP</i> ₅) a partir do extrato total (GIFONI, 2009).	49
06	Perfil cromatográfico obtido após aplicação da fração albumínica de sementes de <i>M. oleifera</i> em matriz de quitina.	61
07	Perfil cromatográfico obtido após aplicação de P _{NAG} em matriz de Resource S acoplada ao sistema de FPLC.	62
08	Eletroforese de <i>Mo-CBP</i> ₄ em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes.	64
09	Eletroforese bidimensional de <i>Mo-CBP</i> ₄ .	65
10	Eletroforese de <i>Mo-CBP</i> ₄ em gel de poliacrilamida em condições nativas para proteínas básicas.	66
11	Eletroforese de <i>Mo-CBP</i> ₄ em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes para identificação de carboidrato.	67
12	Atividade coagulante de <i>Mo-CBP</i> ₄ .	69
13	Fotografia ilustrativa da atividade coagulante de <i>Mo-CBP</i> ₄ .	70
14	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%; PAGE-SDS) de <i>Mo-CBP</i> ₄ submetida à digestão por pepsina.	72

15	Eletrforese em gel de poliacrilamida (15%; PAGE-SDS) de <i>Mo</i> -CBP ₄ submetida à digestão por tripsina ou quimotripsina.	73
16	Eletrforese em gel de poliacrilamida (15%; PAGE-SDS) de <i>Mo</i> -CBP ₄ submetida à digestão seqüencial (S).	74
17	Efeito da administração intraperitoneal de P _{NAG} e <i>Mo</i> -CBP ₄ sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8% em camundongos.	76
18	Efeitos da administração i.p. de <i>Mo</i> -CBP ₄ , em diferentes doses, nas contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8% em camundongos.	77
19	Efeitos da administração oral de <i>Mo</i> -CBP ₄ (10 mg/kg) sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.	79
20	Efeitos da administração i.p. de <i>Mo</i> -CBP ₄ no sobre o aumento da permeabilidade vascular induzido por ácido acético em camundongos.	81
21	Efeitos da administração i.p. de <i>Mo</i> -CBP ₄ sobre a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por ácido acético 0,8% em camundongos.	83
22	Avaliação do envolvimento do sítio de interação a <i>N</i> -acetil-D-glucosamina (NAG) na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de <i>Mo</i> -CBP ₄ .	85

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
01 Composição química das sementes de <i>Moringa oleifera</i>	25
02 Etapas de purificação de <i>Mo-CBP₄</i> , com os respectivos teores e rendimentos protéicos	60
03 Inibição das contorções abdominais induzidas por ácido acético pelo tratamento com P_{NAG} e <i>Mo-CBP₄</i> .	78
04 Efeito de <i>Mo-CBP₄</i> no número de contorções induzidas por ácido acético, via oral	79
05 Efeito de <i>Mo-CBP₄</i> no aumento da permeabilidade vascular e migração leucocitária induzidos por ácido acético em camundongos	82

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	<i>Moringa oleifera</i> LAMARCK	19
2.1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
2.1.2	ASPECTOS BOTÂNICOS	20
2.1.3	UTILIZAÇÃO DE <i>M. oleifera</i>	22
2.1.3.1	Nutrição	22
2.1.3.2	Purificação da Água.....	25
2.1.3.3	Usos Terapêuticos.....	26
2.2	RESPOSTA INFLAMATÓRIA	29
2.3	DOR E NOCICEPÇÃO	35
2.2.2	DOR E NOCICEPÇÃO	20
2.4	LECTINAS DE PLANTAS	37
2.4.1	APLICAÇÕES DE LECTINAS DE PLANTAS.....	39
3	OBJETIVOS	42
3.1	GERAIS	42
3.2	ESPECÍFICOS	42
4	MATERIAIS.....	43
4.1	SEMENTES	43
4.2	ERITRÓCITOS	43
4.3	ANIMAIS	43

4.4 REAGENTES QUÍMICOS	44
5 MÉTODOS	45
5.1 PURIFICAÇÃO DE UMA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA A PARTIR DE SEMENTES DE <i>M. oleifera</i>	45
5.1.1 PREPARAÇÃO DA FARINHA DE SEMENTES DE <i>M. oleifera</i>	45
5.1.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	45
5.1.3 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ALBUMÍNICA	47
5.1.4 CROMATOGRAFIA EM MATRIZ DE QUITINA	47
5.1.5 CROMATOGRAFIA EM MATRIZ DE RESOURCE S ACOPLADA AO FPLC	48
5.1.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	48
5.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE <i>Mo-CBP₄</i>	50
5.2.1 ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	50
5.2.2 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	50
5.2.3 ELETROFORESE NATIVA PARA PROTEÍNAS BÁSICAS	51
5.2.4 DETECÇÃO DE GLICOPROTEÍNA EM GEL	52
5.2.5 QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS	52
5.2.6 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	52
5.2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE	53
5.2.8 AVALIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE IN VITRO DE <i>Mo-CBP₄</i>	54
5.2.8.1 Digestibilidade in vitro de <i>Mo-CBP₄</i> – Enzimas individuais	54
5.2.8.2 Digestibilidade in vitro de <i>Mo-CBP₄</i> – Forma Seqüencial	54
5.3 ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE <i>Mo-CBP₄</i>	55
5.3.1 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	55
5.3.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	56
5.3.2.1 Permeabilidade Vascular Induzida por Ácido Acético	56
5.3.2.2 Migração de Leucócitos Induzida por Ácido Acético	57
5.3.3 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE <i>Mo-CBP₄</i> APÓS INCUBAÇÃO COM <i>N</i> -ACETIL-D-GLUCOSAMINA	58
5.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
6 RESULTADOS	59

6.1	PURIFICAÇÃO DE UMA PROTEÍNA LIGANTE A QUITINA A PARTIR DE SEMENTES DE <i>M. OLEIFERA</i>.....	59
6.2	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE <i>MO-CBP</i>₄	63
6.3	ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE <i>MO-CBP</i>₄	75
6.3.1	ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	75
6.3.2	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	80
6.3.3	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE <i>MO-CBP</i> ₄ APÓS INCUBAÇÃO COM <i>N</i> -ACETIL-D-GLUCOSAMINA	84
7	DISCUSSÃO	86
8	CONCLUSÃO.....	99
	REFERÊNCIAS.....	100
	APÊNDICE	121

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para o tratamento de diversas enfermidades humanas é uma prática muito antiga e constitui a base do sofisticado sistema da medicina tradicional (GURIB-FAKIM, 2006). Embora nos últimos anos essa prática milenar tenha perdido espaço para medicamentos sintéticos, o alto custo desses fármacos e os efeitos colaterais apresentados por eles, aliados à busca de uma vida mais saudável pela população de países desenvolvidos ou em desenvolvimento, motivaram a prospecção de novas moléculas derivadas de produtos naturais com propriedades terapêuticas (RAMOS *et al.*, 2005). Nesse contexto, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008), cerca de 80% da população mundial, principalmente nos países desenvolvidos, utilizam fármacos derivados de plantas de forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos.

Durante as últimas décadas, devido aos avanços em biotecnologia, uma maior ênfase tem sido dada aos efeitos farmacológicos de peptídeos e proteínas (GAIDAMASHVILI e VAN STADEN, 2006). O estabelecimento da tecnologia do DNA recombinante possibilitou o desenvolvimento de uma grande variedade de proteínas terapêuticas para o tratamento de diversas doenças. Atualmente, mais de 130 proteínas ou peptídeos diferentes foram aprovados para o uso clínico pela *US Food and Drug Administration* (FDA) e muitos outros estão em desenvolvimento (LEADER; BACA; GOLAN, 2008). Dentre as vantagens na utilização de proteínas para fins terapêuticos, destaca-se a alta especificidade a um conjunto de funções complexas que moléculas de pequeno tamanho são incapazes de mimetizar, interferindo pouco nos processos biológicos normais, acarretando uma menor quantidade de efeitos adversos (LEADER; BACA; GOLAN, 2008; STROHL e KNIGHT, 2009). Reichert (2003), comparando a aceitação de novas drogas pela FDA no período de 1980 a 2002, demonstrou que proteínas são mais facilmente aceitas e liberadas ao mercado como fármacos, quando comparadas a drogas de baixa massa molecular de natureza não-protéica, evidenciando o sucesso dessa bioterapia.

Apesar da grande diversidade de plantas medicinais existentes, poucas proteínas derivadas de vegetais são exploradas com o objetivo terapêutico, o que

consiste em um fato bastante contraditório. Apenas algumas proteínas, a exemplo da papaína e algumas lectinas com propriedades farmacológicas, encontram-se em uso clínico ou em triagem clínica (LEADER; BACA; GOLAN, 2008; LIU *et al.*, 2010). Portanto, a prospecção de proteínas vegetais com potencial terapêutico torna-se um campo promissor para estudos futuros.

Seguindo essa tendência, *Moringa oleifera*, uma espécie originária do Nordeste da Índia, se destaca pelo seu valor medicinal, uma vez que extratos de todas as partes desta planta mostraram propriedades farmacológicas reconhecidas pelo uso popular e corroboradas pela comunidade científica (FERREIRA *et al.*, 2008). Quase todas as partes da planta podem ser consumidas e são de grande valor nutricional. Além disso, suas sementes são vastamente usadas para purificação de água em lugares que a água potável se encontra escassa (NDABIGENGESERE e NARASIAH, 1996; MAKKAR e BECKER, 1997).

Atividades hipotensiva, anticancerígena, anti-inflamatória, analgésica, antibiótica, antitripanossomal, anti-ulcerativa, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante e hepatoprotetora são propriedades que têm sido reportadas pelo uso popular e estudadas pela comunidade científica (FAIZI *et al.*, 1995; EZEAMUZLE *et al.*, 1996; MURAKAMI *et al.*, 1998; CHUANG *et al.*, 2007; CHUMARK *et al.*, 2008; FAKURAZI *et al.*, 2008; JAISWAL *et al.*, 2009). Em particular, propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva foram reportadas para raízes, folhas e sementes (CÁRCERES *et al.*, 1992; SASHIDHARA *et al.*, 2009; SULAIMAN *et al.*, 2008). No entanto, apesar da forte evidência científica do poder curativo de *M. oleifera*, estudos adicionais enfatizando o isolamento e a caracterização de compostos bioativos tornam-se cruciais por duas principais razões:

- Fornecer suporte científico para o uso de *M. oleifera* como agente medicinal e;
- Elucidar o mecanismo de ação dos tradicionais benefícios terapêuticos de *M. oleifera*, atribuindo à utilização biotecnológica racional de suas partes ou moléculas derivadas.

Baseando-se nas informações apresentadas anteriormente, foi formulada a seguinte pergunta:

“Que princípio ativo está associado às atividades antinociceptiva e anti-inflamatória das sementes de *M. oleifera* e quais características bioquímicas estariam vinculadas a ele?”

Portanto, no intuito de responder ao questionamento supracitado, várias abordagens experimentais foram utilizadas, objetivando isolar um princípio ativo de natureza protéica envolvido nas atividades anti-inflamatória e antinociceptiva atribuídas às sementes de *M. oleifera*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Moringa oleifera* Lamarck

2.1.1 Considerações gerais

Moringa oleifera Lamarck é a espécie mais vastamente cultivada da família monogenérica Moringaceae, que inclui 13 espécies de árvores e arbustos distribuídos próximo ao Himalaia, do Noroeste do Paquistão ao Norte da Índia (RAMACHANDRAN *et al.*, 1980). Essa planta tem sido difundida para muitas partes do mundo, sendo hoje encontrada no Afeganistão, Bangladesh, Sri Lanka, África, Oeste da Ásia e nas Américas, do México ao Peru, Ilhas Caribenhas, Paraguai e Brasil (JAHN *et al.*, 1986; MORTON *et al.*, 1991). Na Índia, ela é conhecida popularmente como *Sajina* e *Shekta* e nos Estados Unidos como *Drumstick* ou “bastão de tambor” devido ao formato de seus frutos. *M. oleifera* adapta-se a uma ampla faixa de solos, crescendo em regiões subtropicais secas e úmidas, tropicais secas e florestas úmidas (DUKE, 1978).

No Brasil, onde foi introduzida por volta de 1950, é encontrada na região Nordeste, principalmente nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará, sendo conhecida popularmente como lírio-branco, quiabo de quina ou simplesmente moringa (AMAYA *et al.*, 1992; MATOS, 1998; CYSNE, 2006).

Trata-se de uma planta de múltiplo uso, onde quase todas as suas partes são ditas como sendo de valor nutritivo (folhas, frutos verdes, flores e sementes) e medicinal (PALADA, 1996; MAKKAR e BECKER, 1997). Atualmente a cultura da *M. oleifera* vem sendo difundida em todo semi-árido nordestino, devido a sua utilização no tratamento de água para o uso doméstico (GALLÃO; DAMASCENO; BRITO, 2006). Suas sementes possuem importância industrial, já que produzem um óleo conhecido como “Ben” usado para lubrificar máquinas e na fabricação de perfumes, além de serem vastamente usadas para purificação da água (DUKE, 1978; MORTON, 1991).

2.1.2 Aspectos Botânicos

Moringa oleifera é classificada taxonomicamente conforme descrito a seguir (Fonte: USDA):

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Dilleniidae

Ordem: Brassicales

Família: Moringaceae

Gênero: *Moringa*

Espécie: *Moringa oleifera* L.

M. oleifera é uma árvore decídua que geralmente cresce até 10 a 12 m de altura. Na América tropical, onde foi introduzida como planta ornamental, é uma planta de porte arbóreo e de tronco único (FIGURA 01). No Brasil, ela aparece bem menor do que na Índia, possuindo caule delgado, muitas vezes único e copa aberta em forma de guarda-chuva (SILVA e KERR, 1999; LORENZI e MATOS, 2002; CYSNE, 2006).

O caule é acinzentado e, quando injuriado, exuda um látex branco. Na medula central há uma grande quantidade de mucilagem, rica em arabinose, galactose e ácido glucurônico. As folhas são verdes-pálida, decíduas alternadas, pecioladas e bipinadas ou mais comumente tripinadas, medindo 45 cm de comprimento, contendo sete folíolos pequenos em cada pina. Os folíolos laterais possuem formas elípticas, enquanto que os terminais são ligeiramente maiores que os laterais. O mesófilo contém cristais de cálcio (CÁCERES *et al.*, 1992).

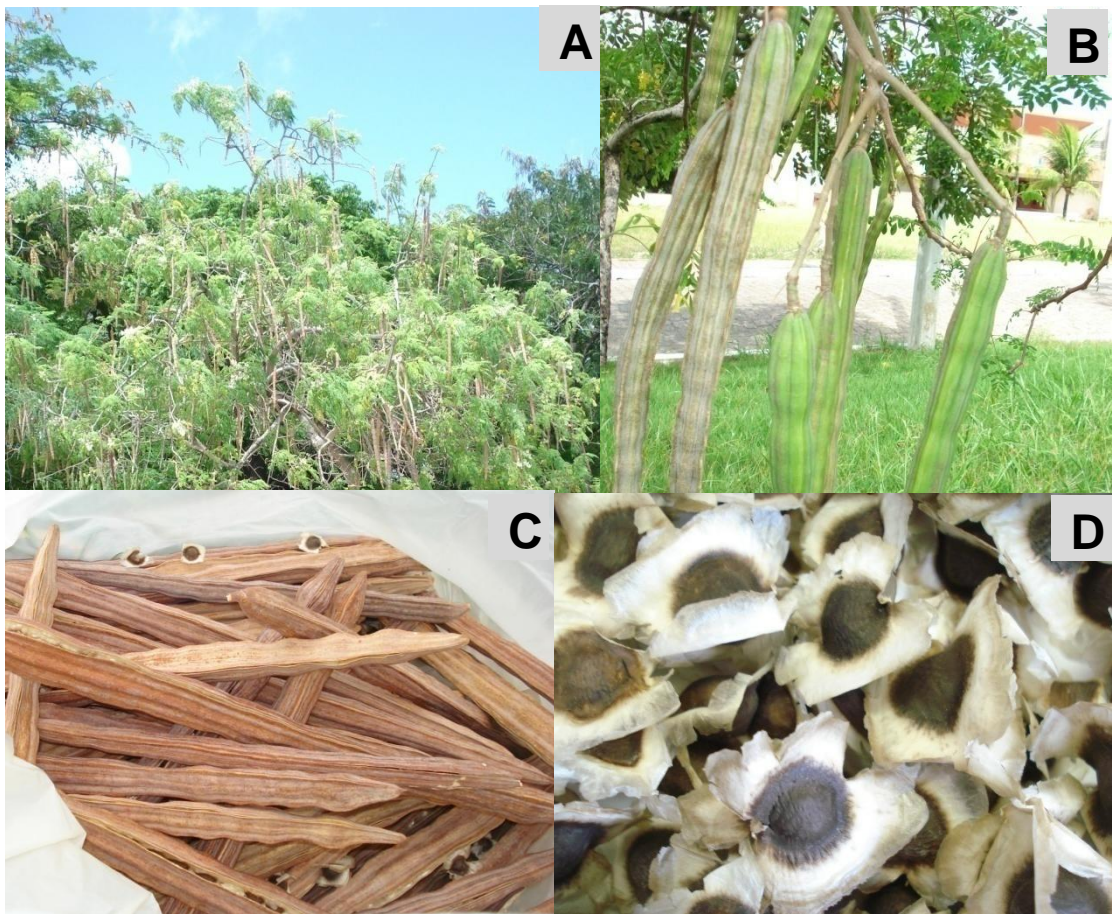


Figura 01. *Moringa oleifera* Lamarck. (A) Árvore de *Moringa oleifera*; (B) Frutos imaturos; (C) Frutos maduros; (D) Sementes aladas.

A raiz assemelha-se na aparência e no sabor ao rábano. A casca da raiz é espessa, mole e reticulada, de cor pardo-clara, externamente, e branca, internamente, lenho mole, poroso e amarelado (CÁCERES *et al.*, 1992).

As flores são divididas em cálice e corola. São monóclinas, perfumadas, de cores creme ou branca, estando agrupadas em inflorescências terminais do tipo cimosa, as chamadas panículas. Em lugares onde o índice pluviométrico é maior do que 600 mm por ano, como nas ilhas do Caribe, as árvores estão sempre floridas; caso contrário, a planta só se reproduz na estação chuvosa. Os frutos são pêndulos lineares, possuindo cor verde a marrom esverdeado, formato triangular e se quebra longitudinalmente em três partes quando seco. Geralmente possuem de 20 a 50 cm de comprimento e armazenam de 10 a 20 sementes. Estas são globóides, escuras por fora e contêm no seu interior uma massa branca e oleosa. O núcleo é encoberto por uma concha sendo trialadas, oleaginosas e medindo até 1 cm de diâmetro (PALANISAMY e KUMERASAN, 1985; LORENZI e MATOS, 2002; CYSNE, 2006).

2.1.3 Utilização de *M. oleifera*

M. oleifera é uma planta multifuncional, tendo como características principais: 1) grande quantidade de proteínas, vitaminas, carboidratos e minerais em toda a planta, o que a torna de alto valor nutricional; 2) presença de agentes coagulantes nas sementes que podem ser usados no tratamento da água; 3) bem documentada na medicina, onde todas as suas partes mostraram propriedades farmacológicas (FOIDL; MAKKAR; BECKER, 2001; FERREIRA *et al.*, 2008).

2.1.3.1 Nutrição

Segundo Dahot (1998), quase todas as partes de *M. oleifera* são consumidas. Ela tem sido usada para combater a desnutrição, especialmente de crianças e mães em período de amamentação. Organizações não-governamentais, em particular *Trees of Life*, *Church World Service* e *Educational Concerns for Hunger Organization*, têm preconizado *M. oleifera* como “nutrição natural dos trópicos” (FAHEY, 2005) podendo ser feita uma associação entre os

países que tem maior índice de desnutrição e aqueles onde *M. oleifera* cresce (FIGURA 02).

As folhas podem ser consumidas frescas, cozidas ou estocadas como pó seco por muitos meses sem refrigeração, mantendo o valor nutricional. Nas regiões secas, onde outros vegetais verdes não podem ser encontrados, as folhas de *M. oleifera* podem ser colhidas e consumidas. Elas são ricas em vitaminas A, B, C e E, cálcio, ferro e fósforo, além de ter uma quantidade razoável de proteínas (8,1%) e carboidratos (14,1%). Em particular, a concentração de vitamina A detectada corresponde em média 23 mil UI/100 gramas, destacando-se de fontes reconhecidas por possuírem alto teor de vitamina A, como o brócolis (5 mil UI), cenoura (3,7 mil UI), espinafre (1,9 mil UI) e alface (1,0 mil UI) (SILVA e KERR, 1999).

Flores e frutos jovens contêm de 5 a 10% de proteínas e são usados na alimentação tanto humana como animal. As raízes possuem um gosto picante, sendo usadas como condimento ou guarnição, secando e misturando com vinagre (MORTON,1991).

A análise química das sementes realizada por Gallão, Damasceno e Brito (2006) mostra que o teor de lipídios é de aproximadamente 19%. Mais de 80% de seu conteúdo são de ácidos graxos insaturados (BHUPTAWAT; FOLKARD; CHAUDHARI, 2007). Este óleo é conhecido comercialmente como *Ben oil* ou *Behen oil* por conter o ácido behênico, resistente à oxidação e extensivamente utilizado na indústria de perfumes. Este óleo é similar ao azeite de oliva, sendo rico em ácidos palmítico, esteárico e oléico (FOIDL; MAKKAR; BECKER, 2001; RASHID *et al.*, 2008). A composição centesimal das sementes mostra que estas possuem elevados teores de proteína, chegando a ser maiores que os valores calculados para leguminosas de importância na alimentação humana, cujas sementes em geral contêm cerca de 18 a 25% de peso seco de proteínas (SINGH e SINGH, 1992) (TABELA 01).

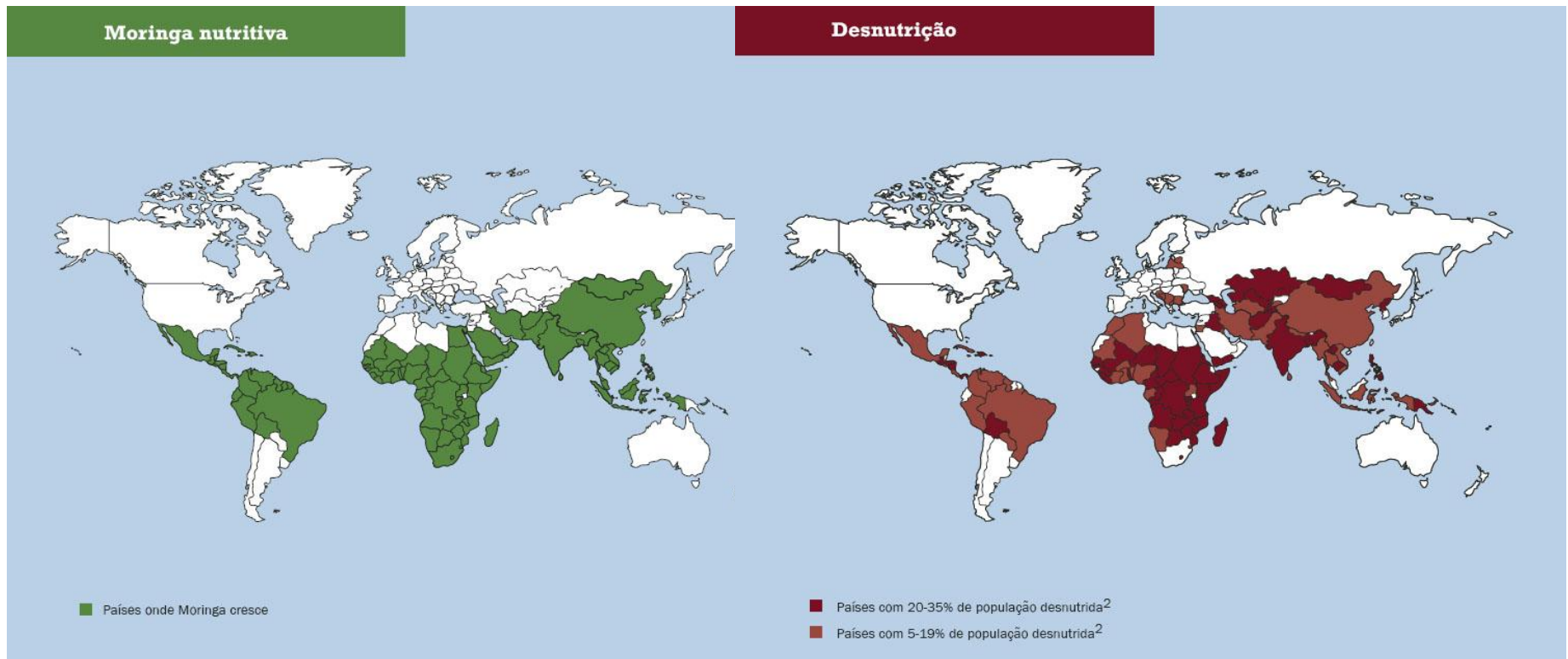


Figura 02. Associação entre os países que têm maior índice de desnutrição e aqueles onde a Moringa cresce (United Nations World Food Programme, 2004).

Tabela 01. Composição química das sementes de *Moringa oleifera*

Composição	Semente
Umidade (%)	6,3
Açúcares solúveis (g/100 g)	3,14
Oligossacarídeos (g/100 g)	3,31
Amido (g/100 g)	6,02
Proteínas (g/100 g)	39,3
Lipídeos (g/100 g)	18,8

Fonte: GALLÃO; DAMASCENO; BRITO, 2006.

2.1.3.2 Purificação da Água

Farinha de sementes de *M. oleifera* é tradicionalmente usada como um coagulante para purificação de água. No Sudão, mulheres da zona rural utilizam o extrato bruto das sementes para tratar a água altamente turva do rio Nilo no lugar de alume (um sal de alumínio usado comumente no tratamento de água), devido ao medo de que esse reagente cause distúrbios gastrointestinais e doença de Alzheimer. Uma ou duas sementes são capazes de tratar um litro de água, reduzindo a turbidez em 92 a 99%.

Acredita-se que os agentes responsáveis pela coagulação sejam proteínas homodiméricas catiônicas de massa molecular em torno de 13 kDa e ponto isoelétrico entre 10 e 11 (NDABIGENGESERE *et al.*, 1995). Gassenschmidt *et al.* (1995) isolaram uma proteína catiônica de sementes de *M. oleifera*, com massa molecular aparente de 6,5 kDa, rica em resíduos de arginina e prolina e possuindo ponto isoelétrico em torno de 10. Essa proteína mostrou atividade coagulante, cujo mecanismo de ação pode ser explicado pela alta densidade de cargas dessa proteína. Em 2005, foi reportado que frações enriquecidas de proteínas coagulantes de sementes de *M. oleifera* foram capazes de coagular material em suspensão, além de agregar bactérias do tipo *Escherichia coli* e *Bacillus thurigiensis*, inibindo o crescimento de tais microorganismos. Tais

proteínas permaneceram ativas quando foram aquecidas a 96 °C, por 5 horas (GHEBREMICHAEL *et al.*, 2005). Recentemente, uma nova lectina chamada de cMoL foi isolada a partir de extrato salino de sementes de *M. oleifera* por cromatografia de afinidade. PAGE-SDS mostrou que cMoL possui massa molecular aparente de 26,5 kDa e em eletroforese nativa básica foi detectada como única banda. Esta proteína além de possuir atividade coagulante similar ao sulfato de alumínio manteve-se ativa após um aquecimento a 100 °C, por 7 horas (SANTOS *et al.*, 2009).

Além de diminuir o barro e bactérias contidas em água não tratada, estudos comprovam que as sementes de *M. oleifera* apresentam efeito higiênico por remover 90% de cercárias (*Schistosoma mansoni*, *Carcariae*) da água utilizada no Sudão (OLSEN, 1987). As sementes também podem ser usadas como bioadsorventes, removendo metais pesados que contaminem a água como o cádmio, arsênio e zinco. O mecanismo de adsorção de tais metais parece estar ligado com os tipos de aminoácidos presentes nas sementes que geram uma atmosfera apropriada para atrair íons, funcionando como bioquelantes (KUMARI *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2006; BHATTI *et al.*, 2007).

2.1.3.3 Usos Terapêuticos

M. oleifera também possui numerosos usos farmacológicos, reconhecidos por sistemas milenares de medicina como a Ayurvédica e Unani e corroboradas pela comunidade científica (MUGHAL; SRIVASTAVA; IQBAL, 1999; FERREIRA *et al.*, 2008).

A combinação das atividades diurética, hipocolesterolêmica e hipotensiva faz com que várias partes dessa planta sejam importantes ferramentas no tratamento e prevenção de desordens cardiovasculares (ANWAR *et al.*, 2007). Compostos ativos isolados de extrato etanólico das folhas de *M. oleifera* foram capazes de diminuir a pressão sanguínea em ratos, mediada possivelmente por antagonismo aos canais de cálcio (GILANI *et al.*, 1994). Extratos etanólico e aquoso dos frutos também tiveram pronunciado efeito hipotensor (FAIZI *et al.*, 1998). Outros estudos mostram que raízes, folhas, flores, látex e infusão aquosa de sementes possuem atividade diurética, que geralmente são usadas como um

auxiliar para o tratamento da hipertensão (MORTON, 1991; CÁCERES *et al.*, 1992). Extrato bruto de folhas de *M.oleifera* reduziu significativamente os níveis de colesterol do sangue de ratos que se alimentavam com uma dieta rica em lipídeos (GHASI; NWOBOBO; OFILI, 2000). Tem sido reportado também que os frutos de *M. oleifera* foram capazes de diminuir os níveis de fosfolipídeos, triglicerídeos e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além de aumentar os níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL), reduzindo a quantidade de lipídios no fígado, coração e aorta de coelhos hipercolesterolêmicos, podendo ser usados na prevenção de aterosclerose (MEHTA *et al.*, 2003).

Atividade anti-espasmódica foi encontrada em raízes e folhas de *M. oleifera*, fornecendo base farmacológica ao tradicional uso desta planta para desordens da motilidade gastrointestinal (CÁCERES *et al.*, 1992; GILANI *et al.*, 1994).

Efeito antiulcerogênico foi encontrado em extratos metanólico e aquoso de folhas (PAL; MUKHERJEE; SAHA, 1995). Foi reportado também atividade hepatoprotetora em raízes e folhas (PAL; MUKHERJEE; SAHA, 1995; RUCKMANI *et al.*, 1998). Em extrato aquoso e alcoólico de flores de *M. oleifera* foi encontrado um flavonóide conhecido como quercetina responsável pelo potente efeito hepatoprotetor (GILANI *et al.*, 1994; RUCKMANI *et al.*, 1998). Recentemente, foi reportado que extrato alcoólico de sementes de *M. oleifera* foi capaz de inibir injúria e fibrose em fígados de ratos por um mecanismo relacionado às propriedades antioxidante e anti-inflamatória, além da habilidade em atenuar a ativação das células armazenadoras de gordura no fígado (HAMZA, 2010).

Makonnen, Hunde e Damecha (1997) reportaram que folhas de *M. oleifera* possuem potencial atividade anti-tumoral. Foram encontrados fitoquímicos promissores para esse tipo de atividade, como o isotiocianato, que foi capaz de inibir a ativação do vírus Epstein-Barr, promotor de tumor (MURAKAMI *et al.*, 1998). Isotiocianato também é conhecido como indutor de enzimas protetoras contra o câncer, principalmente de mama (ZHANG, 1994).

A utilização de *M. oleifera* contra doenças infecciosas da pele e de mucosas já é bem conhecida. Há relatos de pessoas na China e em Taiwan que utilizaram, com sucesso, as sementes no tratamento de dermatoses fúngicas

como “pé-de-atleta” e “tinea” (CHUANG *et al.*, 2007). Usos similares foram relatados na Índia, Paquistão e Sudão (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; JAHN; MUSNAD; BURGSTALLER, 1986; DASTUR, 1977). Estudos apontam que células do dermatófito *Trichophyton rubrum* (fungo causador de “pé-de-atleta”), tratadas com extrato etanólico de sementes de *M. oleifera*, após 24 horas, apresentaram uma ruptura na membrana plasmática e danos nos componentes intracelulares com conseqüente morte celular (CHUANG *et al.*, 2007).

N-benzil tiocarbamato, *N*-benzil carbamato, benzil nitrila e um benzil éster isolados de extrato metanólico dos frutos de *M. oleifera* foram capazes de estimular significativamente a liberação de insulina de células β do pâncreas de roedores. Folhas de *M. oleifera* já eram tradicionalmente usadas para o tratamento de *diabetes mellitus*. Recentemente, foi revelado que extrato aquoso das folhas apresenta potencial hipoglicemiante e antidiabético, dando base científica ao uso popular (FRANCIS *et al.*, 2004; JAISWAL *et al.*, 2009).

M. oleifera também é conhecido na medicina popular por tratar várias indisposições relacionadas à dor e inflamação. Gupta, Mazumder e Chakrabarti (1999) mostraram que o extrato metanólico de raízes de *M. oleifera* foi capaz de deprimir o sistema nervoso central, causando analgesia e potencializando o efeito analgésico da morfina. Foi encontrado também um raro dipeptídeo (acetato de aurantiamida) e um derivado de uréia (1,3-dibenzil urea) responsáveis pelas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato alcoólico das raízes. Tais fitoquímicos exerceram suas atividades via controle de ativação dos mastócitos, inibindo a produção de TNF- α e IL-2 em condições inflamatórias (SASHIDHARA *et al.*, 2009).

Estudos utilizando testes de contorção abdominais, placa-quente, formalina e edema de pata induzido por carragenina, mostraram que o extrato aquoso das folhas possui atividade antinociceptiva centralmente mediada pela via opióide e periféricamente não-opióide, além de atividade anti-inflamatória, sendo estes efeitos exercidos de maneira dose-dependente (SULAIMAN *et al.*, 2008).

Foi reportado também que infusões em água quente das sementes de moringa, quando administradas oralmente, resultavam em significativa inibição de edema de pata induzido por carragenina, demonstrando assim atividade anti-

inflamatória (CÁCERES *et al.*, 1992). Extratos etanólico e etil-acetato das sementes mostraram significativa atividade antipirética em ratos, quando comparado ao controle paracetamol, fármaco conhecido por inibir a produção de mediadores inflamatórios que causam a febre (HUKKERI *et al.*, 2006). A investigação da atividade anti-artrítica de extrato etanólico de sementes de *M. oleifera* demonstrou a atividade anti-inflamatória deste extrato, desde que houve um decréscimo do volume do edema de pata em condições inflamatórias, além de reduzir os níveis de mediadores inflamatórios no sangue e infiltração de leucócitos para a junta sinovial (MAHAJAN; MALI; MEHTA, 2007a). O mesmo extrato etanólico das sementes foi investigado quanto ao seu efeito sobre anafilaxia sistêmica e cutânea, no qual resultou em inibição de ambas as anafilaxias, via inibição da liberação de histamina por mastócitos (MAHAJAN; MALI; MEHTA, 2007b).

Apesar de mais de 40% das sementes constituírem-se de proteína, estas são pouco exploradas no sentido farmacológico. Estas macromoléculas são apenas mencionadas como cosméticos para tratamento da pele e cabelos (ANWAR *et al.*, 2007). Assim, proteínas e frações protéicas de sementes de *M. oleifera* se mostram objetos de estudos inéditos e promissores.

2.2 Resposta Inflamatória

O termo inflamação ou flogose (do latim, *inflamare* e do grego *phlogos*, pegar fogo) retrata como os povos mais primitivos comparavam uma região inflamada com algo relativo a chamas, quente ou ardido. Essa analogia deve ter surgido nos tempos do primeiro contato do homem com o fogo, antes mesmo do controle de sua produção e manipulação. A civilização egípcia antiga deixou, em hieróglifos, os primeiros registros com relatos médicos sobre a identificação e tratamento da inflamação, através do uso de procedimentos e fórmulas (FALTAS, 2004). Celcius caracterizou a inflamação por quatro sinais cardinais: rubor, calor, tumor e dor. No século XIX, um quinto sinal, a perda da função, foi adicionado por Rudolf Virchow (MONTENEGRO e FRANCO, 1999).

Assim, a inflamação é uma reação complexa a vários agentes nocivos, como microorganismos e células danificadas, geralmente necróticas, que consiste

de respostas vasculares, migração de leucócitos e reações sistêmicas (ROBBINS *et al.*, 2005).

A inflamação pode ser aguda ou crônica. A inflamação aguda se inicia rapidamente (em alguns segundos ou minutos) e tem uma duração relativamente curta; suas principais características são a exsudação de fluido e proteínas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos. A inflamação crônica tem uma duração maior e está histologicamente associada à presença de linfócitos e macrófagos, à proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tissular (ROBBINS *et al.*, 2005).

A inflamação aguda consiste em dois componentes principais: uma reação vascular e uma reação celular.

A reação vascular começa imediatamente após a lesão ocorre uma vasoconstrição reflexa, de origem neurogênica, mediada por terminações do sistema nervoso autônomo que dura poucos segundos. A seguir, tem início a vasodilatação, que primeiro envolve as arteríolas, levando a abertura de novos leitos capilares e aumento do fluxo sanguíneo para a região, provocando calor e rubor (ROBBINS *et al.*, 2005).

Nos vasos de pequeno calibre ocorrem modificações que permitem a passagem de proteínas plasmáticas para o espaço extracelular, provocando aumento da pressão oncótica e retenção de água no interstício (edema). O fluido rico em proteínas é chamado de exsudato. Ocorre também a estase sanguínea advinda do aumento de permeabilidade da microvasculatura, uma vez que o extravasamento de líquidos e proteínas para o interstício provoca hemoconcentração, aumentando a viscosidade sanguínea e gerando o alentecimento da circulação. Essas alterações são causadas por substâncias liberadas no local da inflamação, conhecidas como mediadores inflamatórios. Alguns desses mediadores, como a bradicinina, causam dilatação induzindo a liberação de fatores de relaxamento vascular derivados do endotélio (EDRFs). Já foi demonstrado que o óxido nítrico (NO) é um dos EDRFs liberados pelas células endoteliais (PALMER; FERRIG; MONCADA, 1987; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991), que participa do controle do fluxo sanguíneo (FORTES; HYSLOP; DENUCCI, 1994), da expressão de moléculas de adesão e do aumento da

permeabilidade vascular induzida pelo fator ativador de plaquetas (PAF) e pela própria bradicinina (MAYHAN, 1992).

O aumento da permeabilidade vascular, levando ao extravasamento de fluido rico em proteínas (exsudato) para o tecido extravascular pode ocorrer por diferentes mecanismos, dependendo dos receptores ativados na célula endotelial ou da lesão provocada no vaso sanguíneo. O mecanismo mais comum é o da formação de fendas no endotélio vascular, sendo desencadeada pela histamina, bradicinina, leucotrienos, substância P e outras classes de mediadores químicos (MAJNO e PALADE, 1961; MCDONALD; THURSTON; BALUK, 1999). A ligação de mediadores, como a histamina, a seus receptores nas células endoteliais ativam vias de sinalização intracelular que levam à fosforilação de proteínas contráteis e do citoesqueleto, como a miosina (LAMPUGNAMI e DEJANA, 1997; VAN HINSBERG e VAN NIEUW, 2002). Essas proteínas contraem-se e causam a separação das junções intercelulares, formando as fendas. Citocinas como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o interferon- γ (IFN- γ) também aumentam a permeabilidade vascular por causarem uma reorganização estrutural do citoesqueleto, fazendo com que as células endoteliais se retraiam e se separem. Em contraste com os efeitos da histamina, a resposta induzida pelas citocinas é mais demorada e duradoura (ROBBINS *et al.*, 2005).

A reação celular é representada pelo processo de migração de leucócitos (principalmente neutrófilos) durante a resposta inflamatória aguda, que é intermediado por diferentes mediadores inflamatórios e quimiotáticos. Estes promovem um aumento nas interações entre os neutrófilos e as células endoteliais, favorecendo a migração destes leucócitos a favor do gradiente de concentração entre a área lesada e as vênulas pós-capilares (HUTTENLOCHER; SANDBORG; HORWITZ, 1995).

Diversas são as células envolvidas no processo inflamatório, algumas células já estão presentes no tecido afetado, tais como: células endoteliais, mastócitos e células mononucleares residentes. Enquanto outras como os leucócitos polimorfonucleares (PMN) (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos) migram para o local da lesão. Os leucócitos são atraídos para a região afetada por um processo conhecido como quimiotaxia. Os macrófagos residentes participam de vários eventos da

inflamação, sendo responsáveis pela fagocitose do agente agressor e liberação de vários mediadores desencadeando outros eventos inflamatórios como edema e dor (FERREIRA, 1980). Eles atuam na iniciação da mobilização de neutrófilos em direção ao local agredido.

O processo de passagem de leucócitos provenientes do sangue para um tecido inflamado apresenta-se em cinco eventos: marginação, rolamento, adesão, diapedese (transmigração através do endotélio) e quimiotaxia. A adesão leucocitária e a transmigração são reguladas principalmente pela ligação de moléculas de adesão complementares nos leucócitos e nas superfícies das células endoteliais, e pelos mediadores químicos (quimiotaxinas e algumas citocinas), que afetam esses processos modulando a expressão na superfície ou a avidéz dessas moléculas de adesão (LUSCINSKAS *et al.*, 2002; MÜLLER, 2002). Os receptores de adesão envolvidos pertencem a quatro famílias moleculares: selectinas, superfamília das imunoglobulinas, integrinas e glicoproteínas semelhantes a mucina (ROBBINS *et al.*, 2005).

As selectinas, chamada assim por possuírem um domínio N-terminal extracelular relacionado às lectinas que se ligam a açúcares, compreendem a E-selectinas, confinada ao endotélio; P-selectina, presentes no endotélio e plaquetas; e L-selectina, que se expressa na maioria dos tipos de leucócito (GONZALEZ-AMARO e SANCHEZ-MADRI, 1999; MCEVER, 2002).

O recrutamento dos leucócitos para o local da lesão e infecção é um processo que contém várias etapas, envolvendo a ligação dos leucócitos circulantes às células endoteliais e sua migração através do endotélio (FIGURA 03). Células residentes como macrófagos tissulares, mastócitos e células endoteliais respondem aos estímulos nocivos pela secreção de citocinas. TNF- α e a IL-1 atuam nas células endoteliais das vênulas pós-capilares adjacentes à infecção e induzem a expressão de várias moléculas de adesão e de ligantes às integrinas. As moléculas de adesão, como as selectinas, promovem interações de baixa afinidade com os carboidratos presentes na membrana dos leucócitos.

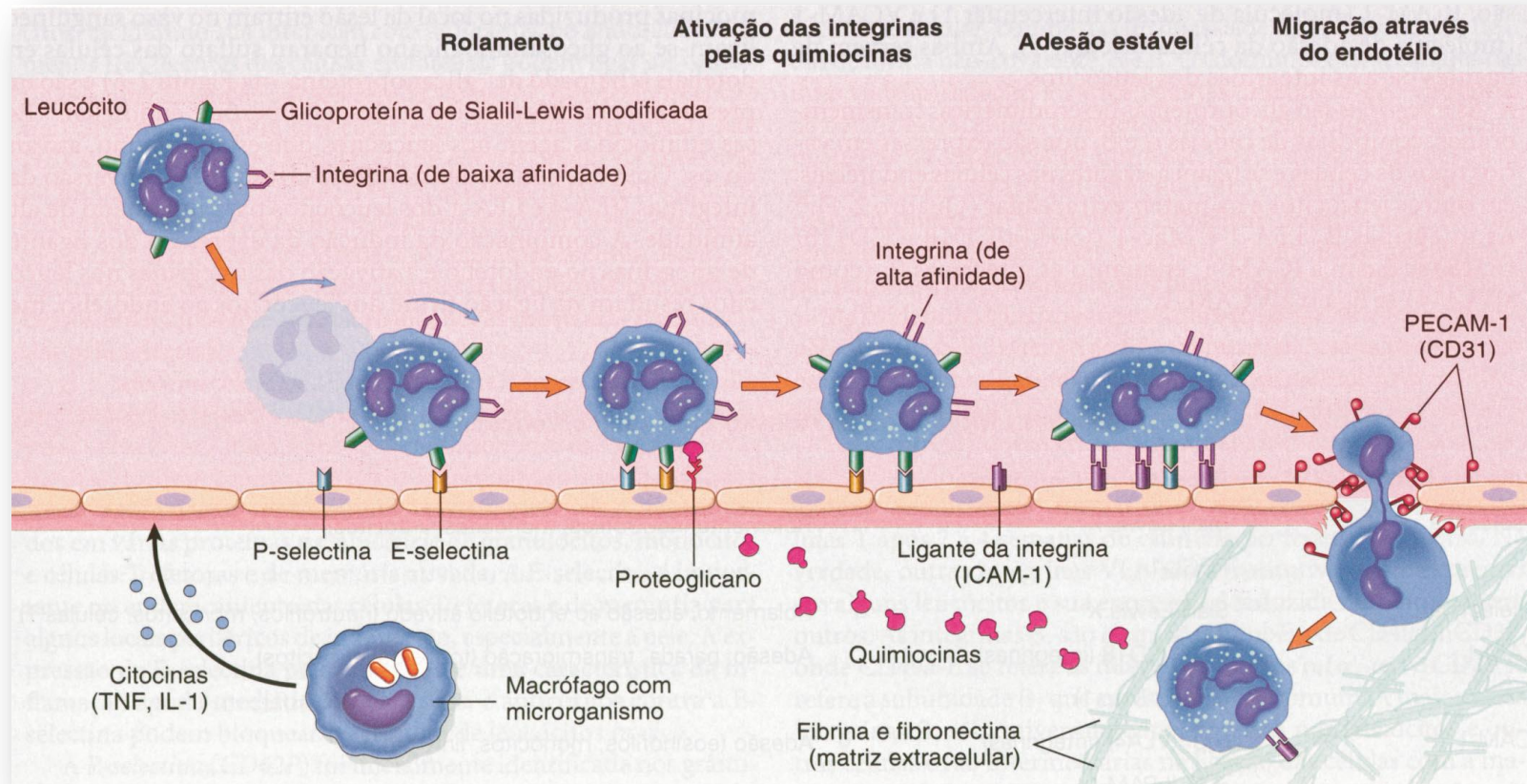


Figura 03. Etapas do processo de migração leucocitária dos vasos sanguíneos para o local da inflamação. Os leucócitos rolam na superfície do endotélio, depois são ativados, aderindo a ele, ocorrendo, então, a transmigração através do endotélio; atravessam a membrana basal e migram seguindo um gradiente quimiotático que se origina no local da lesão. Fonte: ROBINS *et al*, 2005.

Essa interação de baixa afinidade resulta em rolamento dos leucócitos sobre as células endoteliais. O aumento da expressão dos ligantes a integrinas pelas células endoteliais e das integrinas pelos leucócitos resulta na firme ligação dos leucócitos ao endotélio. Os leucócitos param de rolar, seu citoesqueleto é reorganizado e eles se espalham pela superfície endotelial. O próximo passo no processo da migração dos leucócitos através do endotélio se chama transmigração ou diapedese. Quimiocinas agem nos leucócitos aderidos e estimulam as células a migrar através dos espaços endoteliais na direção do gradiente quimiotático, ou seja, na direção do local da lesão ou infecção. Estes leucócitos serão ativados para exercer a aniquilação do agente causador da inflamação (ROBBINS *et al.*, 2005).

Os compostos responsáveis por orquestrar tanto os eventos vasculares como os celulares são os mediadores químicos que, em termos simples, podem ser considerados como mensageiros químicos para a resposta inflamatória. (LANSEN *et al.*, 1993). Tais substâncias modulam uma série de eventos locais, como: vasodilatação, opsonização, quimiotaxia para células inflamatórias, destruição tecidual e dor, como também febre e mal estar. Os mediadores químicos da inflamação podem ser de origem plasmática ou tecidual. Os de origem plasmática são os sistemas de cinina, complemento, de coagulação e fibrinolítico. Os de origem tecidual são as aminas vasoativas (histamina e serotonina), derivados do ácido araquidônico, enzimas lisossomais, radicais livres, fator ativador de plaquetas (PAF), citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e fatores de crescimento (SIQUEIRA e DANTAS, 2000).

As aminas vasoativas, histamina e serotonina, liberadas dos mastócitos e das plaquetas podem ser identificadas no início da inflamação aguda. A histamina é o primeiro mediador a atuar, gerando o aumento da permeabilidade vascular e contração do endotélio venular com alargamento de junções celulares interendoteliais. A serotonina apresenta ações semelhantes as da histamina, correspondendo a um segundo mediador pré-formado (ROBBINS *et al.*, 2005).

Quando as células são ativadas por diversos estímulos, os lipídios em suas membranas são rapidamente remodelados para gerar mediadores lipídicos biologicamente ativos. O ácido araquidônico é um ácido graxo que não

se encontra livre nas células, mas sim na forma esterificada nos fosfolipídios, sendo liberado desses fosfolipídios através da ação de fosfolipases do tipo A₂, que podem ser ativadas por estímulos mecânicos, físicos e químicos ou por outros mediadores (ROBBINS *et al.*, 2005). Vários tipos de células liberam ácido araquidônico em resposta a diferentes estímulos tais como bradicinina, angiotensina II, vasopressina, trombina, colágeno, adrenalina, ADP, peptídeos quimiotáticos e histamina (CARVALHO, 1990). Os metabólitos do ácido araquidônico, também chamados de eicosanóides, são sintetizados por duas classes principais de enzimas: as ciclooxigenases e as lipooxigenases.

A via das ciclooxigenases, iniciada por duas enzimas diferentes (a COX-1, constitutivamente expressa, e a COX-2, uma enzima induzida), leva a geração de prostaglandinas. Estas estão divididas em séries, com base nas características estruturais. As mais importantes no processo inflamatório são: PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ (prostaciclina) e tromboxano-A₂. A PGE₂ causa hiperalgesia, pois torna a pele mais sensível a estímulos dolorosos (ROBBINS *et al.*, 2005).

Na via da lipoxigenase o produto principal, a HETE, que é quimiotática para neutrófilos é convertida em uma série de compostos conhecidos como leucotrienos. Dentre os leucotrienos mais importantes está o LTB₄, que causa aderência de neutrófilos ao endotélio das vênulas pós-capilares, sendo também um potente agente quimiotático para neutrófilos. O LTC₄, LTD₄ e LTE₄ causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular (SIQUEIRA e DANTAS, 2000).

2.3 Dor e Nocicepção

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês IASP), a dor é definida como uma sensação e experiência emocional desagradável associada com um dano tecidual atual ou potencial, ou descrita como tal dano.

Em condições normais, a dor está associada com a atividade elétrica em fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro dos nervos periféricos (RAJA *et al.*, 1999). Estes nervos têm terminações sensoriais nos tecidos periféricos chamados de nociceptores e são ativados por estímulos de vários tipos:

mecânico, térmico ou químico (CESARE e MCNAUGHTON, 1997; JULIUS e BASBAUM, 2001). Os nociceptores são distinguidos de outros tipos de receptores mecânicos e térmicos pelo seu limiar mais alto, pois normalmente são ativados somente por estímulos de intensidade suficiente para causar algum grau de lesão tecidual (RANG *et al.*, 2007).

Em muitas condições patológicas, a lesão tecidual é a causa imediata da dor e isto resulta na liberação de uma gama de agentes químicos que se supõe atuarem sobre as terminações nervosas, ativando-as diretamente ou aumentando a sua sensibilidade a outras formas de estímulo (RANG *et al.*, 2007).

Dentre os mediadores que têm sido propostos na gênese e na transmissão da dor, destacam-se os provenientes de processo inflamatório como os metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), bradicinina, histamina, serotonina, citocinas, óxido nítrico, taquicininas, substância P, colecistocinina, adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), prótons, entre outros. Além desses, aminoácidos excitatórios (glutamato, aspartato), acetilcolina e outros compostos que podem ser produzidos ou liberados após lesão tecidual ou, ainda, por irritantes exógenos (como o ácido acético), são também responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão da dor tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central (RANG *et al.*, 2007).

Nesse contexto, substâncias capazes de diminuir a condição inflamatória podem ser empregadas no tratamento contra a dor, com o intuito de inibir a produção de mediadores inflamatórios, ou ainda, no bloqueio das atividades das fibras aferentes, como os bloqueadores dos canais iônicos. Na verdade, a grande maioria dos fármacos presentes no mercado que são utilizados para o controle da dor possui um cunho anti-inflamatório (MENDELL e SAHENK, 2003). As drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINEs) constituem um bom exemplo do inacabado cenário da busca pelo analgésico ideal. As drogas inibidoras da COX-2, de cunho mais específica, ainda não tem mostrado efeitos satisfatórios devido aos seus efeitos colaterais, como ação citotóxica direta, além do risco potencial de problemas cardiovasculares (MUKHERJEE, 2002; TOMISATO *et al.*, 2004). Mais recentemente, tem-se investigado a utilização clínica de DAINes combinados com opióides (MIRANDA; PRIETO; PINARDI,

2005) ou óxido nítrico (MILLER e MEGSON, 2007). Além disso, as descobertas sobre a COX-3 abrem uma nova perspectiva de explicação dos mecanismos centrais de inibidores da dor e febre (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

2.4 Lectinas de Plantas

Lectinas foram originalmente detectadas por um estudante de medicina chamado Stillmark (1888), em Dorpat/Estônia, quando ele estava trabalhando com mamona (*Ricinus communis* L.). Naquela época, ele notou a presença de um fator tóxico de natureza protéica que era capaz de aglutinar eritrócitos.

O termo lectina (do latim *legere*, verbo que quer dizer selecionar) foi adotado primeiramente por Boyd e Reguera (1949), muitos anos antes de ser enfatizado a habilidade hemaglutinante destas proteínas.

Atualmente, lectinas são definidas como (glico)proteínas que possuem pelo menos um domínio não-catalítico, o qual se liga reversivelmente e especificamente a um mono ou oligosacarídeo (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). Lis e Sharon (1998) completaram a definição enfatizando a origem não-imune destas proteínas e que a ligação ao carboidrato pode ser do tipo pontes de hidrogênio ou interações de Van Der Waals.

As lectinas são proteínas ubíquas, com ampla distribuição na natureza, tendo sido encontradas em bactérias, fungos, algas, vegetais superiores, vertebrados, invertebrados e vírus. Contudo, lectinas de plantas são as mais estudadas atualmente devido às suas importâncias econômica e nutricional e também por serem de fácil isolamento através de cromatografia de afinidade (LIS e SHARON, 1998).

Geralmente, as lectinas vegetais são mais abundantes em sementes, porém elas são também encontradas em diferentes tecidos como raízes, folhas, caule, flores, bulbos e rizoma (BROEKAERT; ALLEN; PEUMANS, 1987; PEUMANS *et al.*, 1997; RATANAPO; NGAMJUNYAPORN; CHULAVATNATOL, 1998; VAN DAMME *et al.*, 2000; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004).

Considerando a estrutura global das lectinas, elas podem ser divididas dentro de quatro classes principais: merolectinas, que são proteínas que tem um único domínio ligante a carboidrato; hololectinas, compreendendo todas as

lectinas com dois ou mais sítios de ligação a carboidrato; quimerolectinas, proteínas consistindo de um ou mais domínios de ligação a carboidrato adicionado de um outro sítio catalítico em um domínio distinto daquele(s) ligante(s) a carboidrato; superlectina, que são lectinas que possuem dois ou mais domínios ligantes a carboidratos, sendo que esses domínios têm especificidade por açúcares diferentes (PEUMANS e VAN DAMME, 1995; VAN DAMME *et al.*, 1998).

Apesar de as lectinas de plantas serem consideradas como um grupo muito complexo e heterogêneo, é possível subdividir estas proteínas em sete famílias estruturalmente e evolucionariamente relacionadas: lectinas de leguminosas, lectinas ligantes à quitina, lectinas relacionadas à jacalina, lectinas RIP tipo 2, lectinas da família amarantina e lectinas do floema das curcubitáceas (MURDOCK e SHADE, 2002).

Lectinas ligantes à quitina de classe I são proteínas que contêm um ou mais domínios heveínicos. O termo heveína refere-se a um polipeptídeo de 43 resíduos de aminoácido, encontrado no látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*). Estas lectinas são ubíquas em plantas e se ligam especificamente ao carboidrato *N*-acetil-*D*-glucosamina ou ao biopolímero formado por resíduos deste mesmo carboidrato (RAIKHEL e LEE, 1993; ASENSIO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2006). Dentre as lectinas ligantes à quitina destacam-se aquelas encontradas em sementes de *Chelidonium majus*, *Phytolacca americana*, *Urtica dioica* (UDA), gérmen de trigo (WGA), *Ozyra sativa*, *Triticum aestivum*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum*, dentre outras (RAIKHEL e LEE, 1993; CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002; TRINDADE *et al.*, 2006).

Propriedades moleculares, bioquímicas, celulares, fisiológicas e evolucionárias têm indicado um papel na defesa de plantas para as lectinas em geral (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). Como as lectinas ligantes à quitina de plantas reconhecem um carboidrato típico da parede celular de fungos e exoesqueleto de invertebrados, sugere-se que estas proteínas tenham um importante papel na defesa de planta contra patógenos e insetos (GHOSH, 2009). Essas lectinas formam o grupo de proteínas relacionadas à patogênese do tipo quatro (PR-4), classe I, e são caracterizadas como tendo massa molecular entre 3,1 e 20 kDa, ponto isoelétrico básico e são resistentes a

variação de pH, temperatura e tratamento com proteases (THEIS e STAHL, 2004).

2.4.1 Aplicações de Lectinas de Plantas

Devido à habilidade de se ligar e distinguir carboidratos determinantes em células humanas, as lectinas se tornaram alvo de grandes descobertas de interesse clínico (SHARON, 2007 *apud* LIU;BIAN; BAO, 2010).

No campo da oncologia, destaca-se a vantagem da associação de fármacos quimioterápicos a lectinas ligantes de glicoconjugados presentes na superfície de células tumorais, o que possibilita um direcionamento desses fármacos, bem como a diminuição de sua dose terapêutica (GOLDSTEIN *et al.*,1980).

Uma lectina isolada de sementes de *Cratylia mollis* mostrou forte ligação a tecidos cancerígenos, particularmente em glândulas mamárias, útero e cérebro, e podendo, quando encapsuladas, exibir efeito anti-tumor através da estimulação do sistema imune de animais (ANDRADE *et al.*, 2004). Avides, Teixeira e Vicente (2010) isolaram uma lectina ligante à galactose de sementes de *Artocarpus incisa*, que foi capaz de induzir apoptose em linhagens de células de carcinoma mamário e cervical.

Lectinas promoveram avanços na endocrinologia. Como exemplo pode ser citada a promoção da absorção oral da insulina via lipossomos acoplados a lectina, como a WGA, pela combinação sítio-específica desta lectina a células da membrana do trato gastrointestinal (ZHANG *et al.*, 2005). Foi relatada também a fosforilação do receptor para insulina, induzida por lectinas vegetais glucose/manose específicas *in vitro* (CAVADA *et al.*, 2003).

Uma outra participação dessas proteínas é na contratilidade de músculo liso, pois o tratamento de coelhos com a ricina aumentou significativamente a contração induzida por serotonina e histamina (ZHANG; HSU; ROBINSON, 1994). Posteriormente, foi demonstrado que a WGA e a lectina da alga vermelha *Bryothamnion triquetrum* estimulam a liberação do fator relaxante derivado do endotélio (KLEHA; DEVESLY; JOHNS, 1991; LIMA *et al.*, 2004).

No tocante às ações na inflamação e sistema imune, experimentos *in vitro* demonstraram que lectinas de plantas podem exercer ações pró ou anti-

inflamatórias dependendo da via em que são administradas (ALENCAR *et al.*, 2004). Estes efeitos geralmente são oriundos da ativação ou inibição de neutrófilos, via interação entre o domínio ligante a carboidrato da lectina e resíduos de carboidratos presentes na membrana das células, por um mecanismo indireto (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

Lectinas da subtribo Diocleinae foram capazes de provocar mitose em linfócitos humanos e induzir a produção de interferon- γ (BARRAL-NETO *et al.*, 1992; MACIEL *et al.*, 2004), além de estimular liberação de histamina por mastócitos peritoneais de ratos (GOMES *et al.*, 1994). Foi demonstrado também que a lectina de soja e das leguminosas *Dioclea grandiflora*, *Canavalia brasiliensis* e *Vaitarea macrocarpa* induziram migração de leucócitos e formação de edema de pata em ratos (BENTO *et al.*, 1993; ALENCAR *et al.*, 2003, 2004, 2007; FREIRE *et al.*, 2003; ALENCAR *et al.*, 2005a,b,c; COELHO *et al.*, 2006), o que vislumbra a melhora do tratamento de infecções, principalmente em pacientes imunossuprimidos.

Apesar do potencial pró-inflamatório bem comprovado, resultante da administração local de lectinas, algumas dessas proteínas, quando administradas endovenosamente, apresentam potente ação anti-inflamatória (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 2005; SANTI-GADELHA *et al.*, 2006; MOTA *et al.*, 2006). É o caso das lectinas isoladas de *Dioclea virgata* e *Lonchocarpus sericeus* que foram capazes de inibir a migração neutrofílica induzida por carragenina em ratos (ALENCAR *et al.*, 1999). Em trabalho recente, foi demonstrado que o potencial anti-inflamatório da lectina de *L. sericeus* é, em parte, devido à habilidade desta lectina em inibir o rolamento e adesão dos leucócitos no endotélio vascular *in vivo* (NAPIMOGA *et al.*, 2007).

Alguns estudos apontam que lectinas que possuem como açúcares ligantes *N*-acetil-D-glucosamina (GlycNac) e glucose-manose inibem a infiltração neutrofílica em diferentes modelos de inflamação (ASSREUY *et al.*, 1988; ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999). Experimentos realizados por Alencar *et al.* (1999), para estudar o papel de resíduos de açúcares no recrutamento de leucócitos, mostraram que glicoconjugados contendo GlycNac são essenciais para o recrutamento de neutrófilos. Adicionalmente, foi relatado que algumas lectinas de plantas com ligação específica a esse carboidrato inibiram a secreção de histamina de mastócitos *in vitro* (BACH e BRASHLER,

1975; MATSUDA *et al.*, 1994). Lectina isolada de sementes de *Araucaria angustifolia*, que possui como carboidrato ligante específico o GlycNac, exerceu efeito anti-inflamatório, atuando como antagonista de receptores de membrana de mastócitos, inibindo, assim, a liberação do conteúdo de seus grânulos. Porém, essa mesma proteína exerceu efeito pró-inflamatório quando injetada subcutaneamente, atuando como agonista dos receptores de membrana dos mastócitos e ativando a liberação de mediadores inflamatórios (MOTA *et al.*, 2006).

Ao que se refere à nocicepção, os trabalhos relacionados à lectinas com atividade antinociceptiva geralmente estão ligados a inibição da inflamação. Lectinas de *Canavalia grandiflora* e *Lonchocarpus sericeus* possuem atividade antinociceptiva relacionada à inibição do influxo de neutrófilos (NAPIMOGA *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2009). Contudo, recentemente, foi mostrado que uma lectina isolada de sementes de *Canavalia boliviana* (CboL) apresentou efeito antinociceptivo de origem tanto periférica quanto central, envolvendo a participação do sistema opióide via domínio lectínico (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

Portanto, lectinas são promissores agentes anti-inflamatórios e antinociceptivos que ainda merecem estudos a fim de esclarecer mecanismos de ação e potencial utilização para fins terapêuticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Purificar e caracterizar bioquimicamente uma proteína ligante à quitina, presente em sementes de *Moringa oleifera*, bem como avaliar seus efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo.

3.2 Específicos

- Purificar uma proteína ligante à quitina, a partir de sementes de *M. oleifera*, através de técnicas cromatográficas;
- Caracterizar físico-química e biologicamente a proteína purificada através da determinação da massa molecular e ponto isoelétrico, detecção de glicoproteína, digestibilidade e avaliação de atividade hemaglutinante;
- Investigar o potencial antinociceptivo da proteína purificada, através de testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético;
- Investigar o potencial anti-inflamatório da proteína purificada, através do ensaio de permeabilidade vascular e migração leucocitária induzidas por ácido acético.

4. MATERIAIS

4.1 Sementes

Sementes de *Moringa oleifera* Lamarck foram coletadas de árvores situadas no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), nos meses de Dezembro de 2008 e Janeiro de 2009. A exsicata da espécie está depositada no Herbário Prisco Bezerra sob o número EAC34591, na UFC.

4.2 Eritrócitos

Eritrócitos utilizados nos ensaios de aglutinação foram obtidos de amostras de sangue de coelho albino adulto (linhagem Nova Zelândia), mantido no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, bem como de sangue humano, dos grupos A, B e O, provenientes do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), com massa corpórea variando entre 20 e 30 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da UFC. Os animais foram divididos em grupos experimentais (n = 6/grupo), mantidos em caixas plásticas contendo água e ração *ad libitum*, tendo sido previamente aclimatados (25 °C) em ciclo claro/escuro de 12 horas, antes da realização dos experimentos. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. Após o término dos protocolos experimentais, os animais foram sacrificados através da inalação por halotano.

Os protocolos experimentais foram realizados em conformidade com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigações experimentais da dor em animais conscientes, revisto e aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Animais (CEPA) da UFC, Brasil.

4.4 Reagentes Químicos

Acrilamida, *N,N'*-metileno bisacrilamida, albumina sérica bovina, azul de Evans, β -alanina, "Coomassie Brilliant Blue" G e R, ditioneitol, marcadores de massa molecular, *N*-acetil-*D*-glucosamina, pepsina, persulfato de amônio, quimotripsina, quitina, TEMED, Tris (Ultra Pure Tris) e tripsina foram obtidos de Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA.

β -mercaptoetanol, dodecil sulfato de sódio e Indometacina (Indocid®) foram obtidos da Merck, Darmstadt, Alemanha.

A matriz de Resource™ S foi adquirida da GE Healthcare, Suécia.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

5. MÉTODOS

5.1. Purificação de uma Proteína Ligante à Quitina a Partir de Sementes de *M. oleifera*

5.1.1 Preparação da Farinha de Sementes de *M. oleifera*

As sementes coletadas foram destegumentadas manualmente. No intuito de diminuir o tamanho das partículas e otimizar a extração de proteínas, as amêndoas foram trituradas em liquidificador e logo após processadas em moinho elétrico de café.

A farinha obtida foi tratada com éter de petróleo, na proporção 1:10 (m/v), temperatura ambiente para a completa remoção dos lipídeos. Após a delipidação, a farinha foi deixada sobre papel de filtro até a evaporação total do solvente, sendo então conservada em frascos hermeticamente fechados a 4°C.

5.1.2 Extração de Proteínas

A extração das proteínas foi realizada seguindo a metodologia descrita por Gifoni (2005). A farinha delipidada foi posta em contato com tampão Tris-HCl 0,050 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M, na proporção 1:7 (m/v) e deixada sob agitação moderada por 3 horas a 4 °C. Em seguida, a suspensão foi filtrada em pano de trama fina. O resíduo foi posto novamente em contato com o tampão, porém na proporção 1:3 (m/v) e submetido à agitação contínua por 1 hora, a 4 °C. Os filtrados foram reunidos e centrifugados a 15.000 x *g*, 30 minutos a 4 °C; o precipitado foi descartado e o sobrenadante, após filtração em papel de filtro, denominado de extrato total (FIGURA 04).

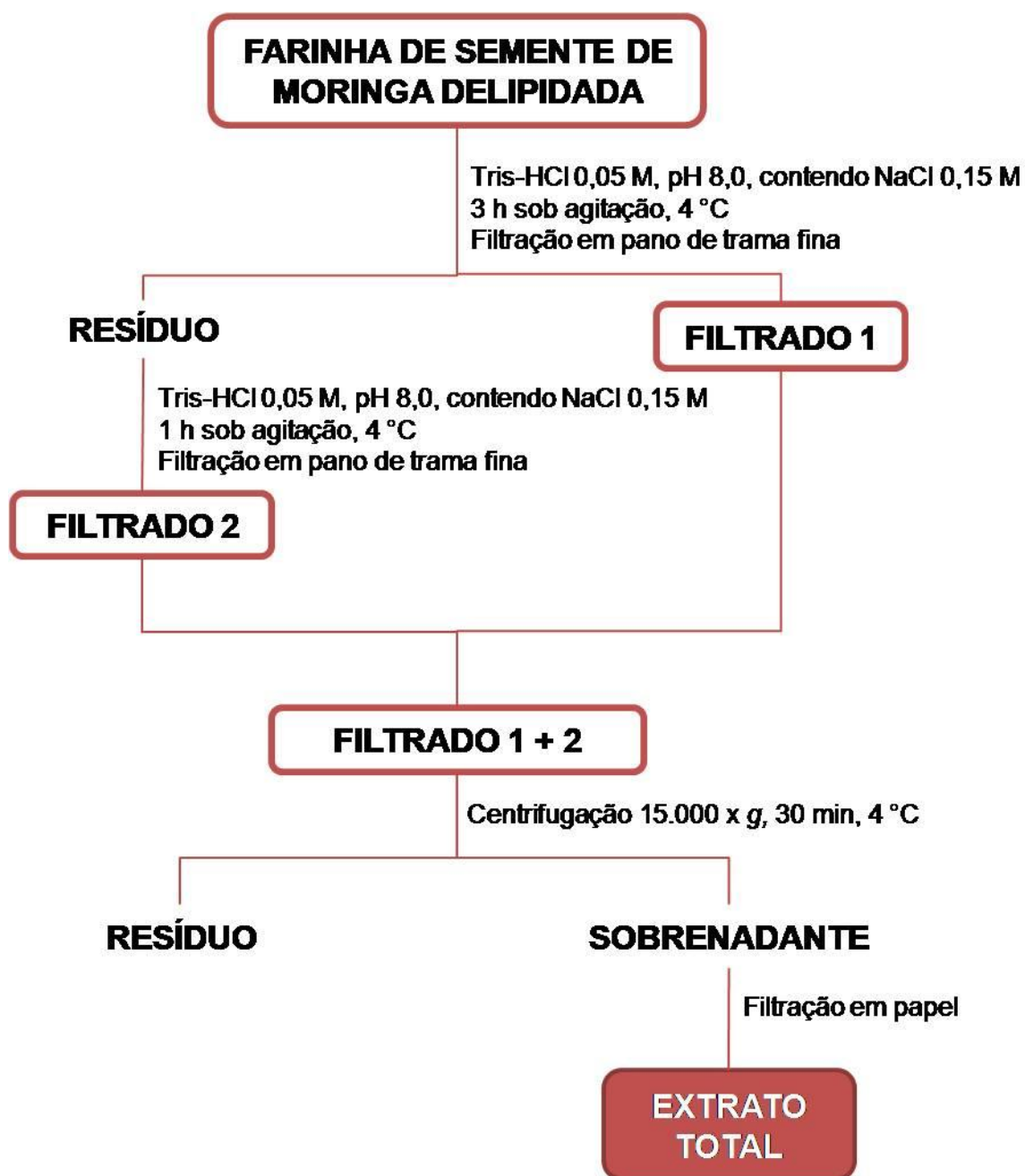


Figura 04. Esquema de obtenção do extrato total a partir de sementes de *Moringa oleifera*, segundo Gifoni (2005).

5.1.3 Obtenção da Fração Albumínica

O extrato total foi submetido à diálise exaustiva contra água destilada, em membrana de porosidade de 12 kDa, 4 °C, sob agitação moderada. A suspensão obtida foi centrifugada a 15.000 x *g*, por 30 minutos, a 4 °C. O material protéico presente no sobrenadante, chamado de fração albumínica, foi separado do precipitado (fração globulínica).

Como exposto na FIGURA 05, as albuminas foram concentradas por precipitação com sulfato de amônio na faixa de saturação de 0-90%. Após um tempo de contato de 12 horas, tal suspensão foi centrifugada a 15.000 x *g*, por 30 minutos, a 4 °C. O precipitado foi ressuscitado em tampão de extração (20 mL), dialisado contra o mesmo tampão e utilizado na etapa cromatográfica posterior (GIFONI, 2005).

5.1.4 Cromatografia em Matriz de Quitina

Este passo cromatográfico foi realizado com a finalidade de isolar apenas as proteínas ligantes a quitina (GIFONI, 2005). A matriz de quitina (192,3 mL) foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,050 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. A fração 0-90%, previamente dialisada contra tampão de equilíbrio (575 mgP), foi centrifugada a 8.000 x *g*, por 5 minutos, a 4 °C e aplicada na coluna (3,5 x 20,0 cm). O volume aplicado foi de 15 mL, em um fluxo de 60 mL/h, sendo coletadas frações de 2,2 mL. As proteínas não retidas foram eluídas com o mesmo tampão de equilíbrio; já o material retido na coluna foi eluído, primeiramente, com *N*-acetil-*D*-glucosamina 0,1 M (P_{NAG}) e, em seguida, com ácido acético 0,05 M (P_{AC}). As frações eluídas foram monitoradas por leitura de absorbância a 280 nm.

O material não retido na coluna foi descartado, enquanto que P_{NAG} foi dialisado contra água destilada, liofilizado e acondicionado em frascos hermeticamente fechados, a 4 °C (FIGURA 05).

5.1.5 Cromatografia em Matriz de Resource S Acoplada ao FPLC

O material eluído da matriz de quitina com *N*-acetil-D-glucosamina (P_{NAG} ; 15 mg) foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de Resource S (6,4 mm x 30 mm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, tal como descrito por Gifoni (2009). Todas as proteínas eluídas receberam a denominação de *Mo*-CBP (*Mo*: *Moringa oleifera* e CBP: *chitin-binding protein*), acrescidas de um número na ordem em que foram eluídas. As proteínas não retidas foram eluídas utilizando o tampão de equilíbrio, onde o pico resultante foi chamado de *Mo*-CBP₁. As proteínas retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio acrescido de concentrações crescentes de NaCl 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M e 0,7 M, sendo os picos obtidos chamados de *Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃, *Mo*-CBP₄ e *Mo*-CBP₅, respectivamente. O processo cromatográfico foi desenvolvido em sistema de FPLC, a um fluxo constante de 1,0 mL/min, sendo coletadas frações de 2 mL/tubo (coletor Pharmacia LKB FRAC-100). A cromatografia foi monitorada através de leituras de absorbância a 280 nm (FIGURA 05)

Depois de liofilizado, *Mo*-CBP₄ mostrou-se como o material com maior rendimento, portanto foi o pico escolhido para caracterização bioquímica e avaliação de suas propriedades biológicas.

5.1.6 Determinação de Proteínas

A determinação de proteínas totais foi realizada seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976). A 100 μ L de amostra, em diversas concentrações, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 minutos foram feitas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro (tipo Novapesc II, Pharmacia) a 595 nm. A concentração protéica foi estimada através de uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

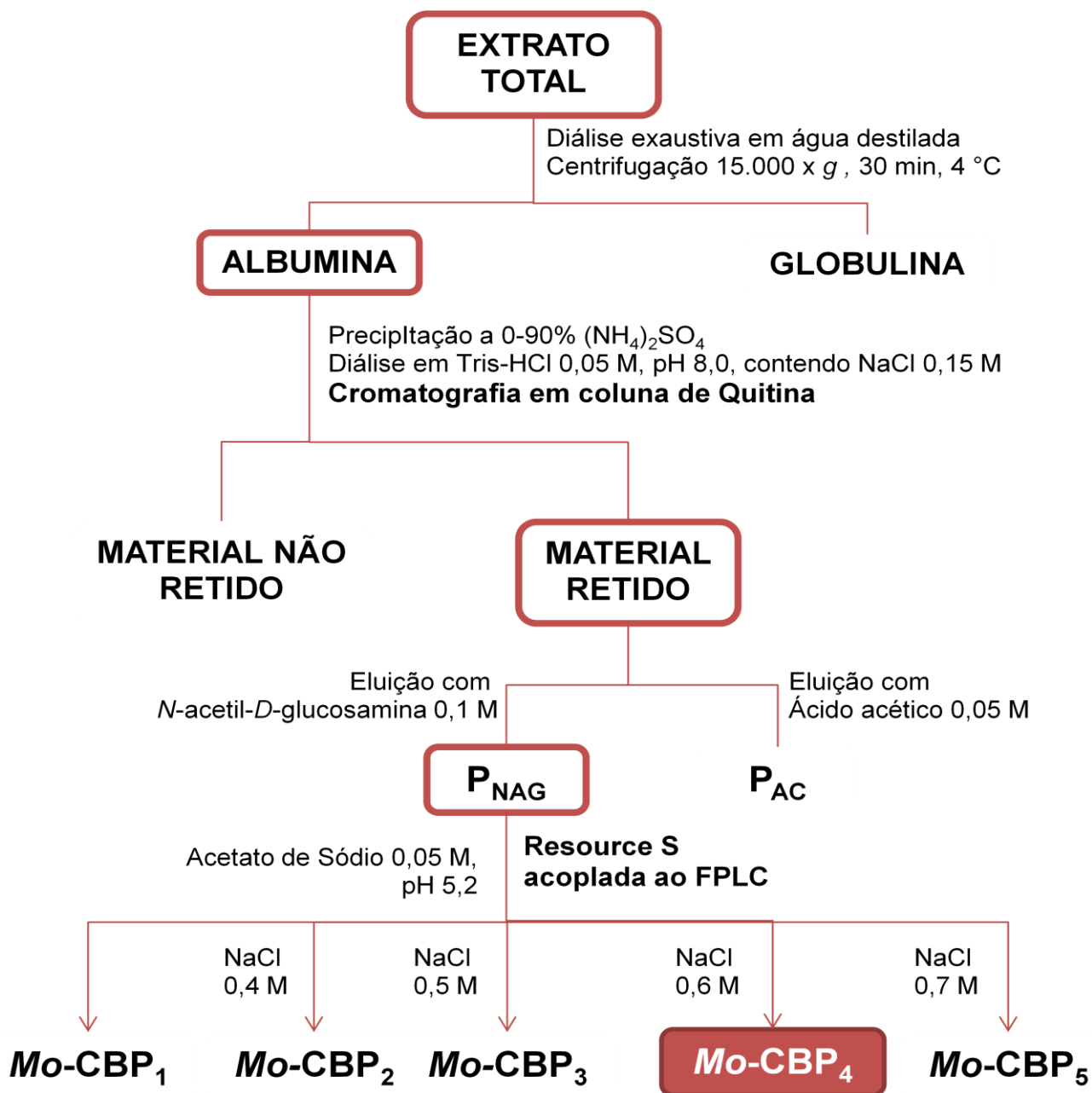


Figura 05. Esquema geral de purificação das proteínas ligantes à quitina ($MoCBP_1 - MoCBP_5$) a partir do extrato total (GIFONI, 2009).

5.2 Caracterização Bioquímica de *Mo*-CBP₄

5.2.1 Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida

Com o objetivo de verificar a pureza de *Mo*-CBP₄, bem como determinar sua massa molecular aparente, foi realizada eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso em placas medindo 10,0 x 8,0 cm. O gel de aplicação encerrava 3,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, preparados em tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8, e o gel de separação, 15% de acrilamida e 1,0% de SDS, em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. A proteína foi dissolvida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, contendo 1,0% de SDS, na presença ou não de β-mercaptoetanol, 1,0% e, em seguida, aquecida a 100 °C, por 10 minutos, e centrifugada a 10.000 x g, por 5 minutos (10 °C). Ao sobrenadante, foram adicionados cristais de glicina além de azul de bromofenol 0,1%, para conferir densidade e cor, respectivamente. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical (MV10COMP, Biosystems), onde o gel foi submetido a uma voltagem de 200 V e amperagem 35 mA. Como marcadores de massa molecular foram utilizados: fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica bovina (67,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica bovina (29,0 kDa), inibidor de tripsina da soja do tipo Kunitz (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,2 kDa). As bandas protéicas foram visualizadas através da coloração por *Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,25% dissolvido em uma solução de metanol, ácido acético e água (1,0:3,5:8,0 v/v/v), por um período de 2 horas. Em seguida, foi procedido o descolorimento do gel com solução de metanol, ácido acético e água (1,0:3,5:8,0 v/v/v). Comparação das mobilidades das bandas protéicas em relação àquelas dos marcadores foi empregada para o cálculo da massa molecular aparente de *Mo*-CBP₄.

5.2.2 Eletroforese Bidimensional

A determinação do ponto isoelétrico de *Mo*-CBP₄ foi efetuada através de eletroforese bidimensional seguindo o protocolo descrito e modificado por Görg *et al.*, 2000. Amostras de *Mo*-CBP₄ (50 µg) foram ressuspensas em 200

μ L de tampão de re-hidratação composto por uréia 8 M, 7 mg de DTT, CHAPS 2%, azul de bromofenol e 2% de tampão IPG (pH 6-11; GE Helthcare), centrifugadas a 10.000 x g, durante 5 minutos e aplicados em tiras (strips) de 11 cm com variação não linear de pH de 6 a 11, sendo deixados em contato com a amostra durante a noite. A focalização isoeétrica foi realizada em focalizador Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech) seguindo os seguintes parâmetros: 1 h a 200 V; 2 h a 500 V; 2 h a 5.000 V e 10.000 V até atingir 18.000 V. Em seguida, as fitas foram imersas em uma solução de equilíbrio contendo uréia 6 M, DTT 1%, SDS 2% e azul de bromofenol durante 15 minutos e submetidas à separação na segunda dimensão por eletroforese desnaturante descontínua descrita por Laemmli (1970). Foram utilizadas placas de 18 x 24 x 0,15 cm e as corridas foram conduzidas a 250 V, 50 mM e 10 W, durante 5 horas em temperatura constante de 4 °C. Os marcadores de massa molecular foram os mesmos utilizados na eletroforese desnaturante descontínua descrita no item anterior. A coloração dos géis foi efetuada utilizando Coomassie Coloidal (WANG; LI; LI, 2007). Os géis obtidos foram digitalizados (*LabScan software*) e analisados utilizando o programa *Image Master TM 2D Platinum v. 7.0* (GE Helthcare).

5.2.3 Eletroforese Nativa para Proteínas Básicas

A eletroforese nativa para proteínas básicas foi conduzida de acordo com o método descrito por Reisfield (1962) e adaptado para géis em placas. O gel de aplicação continha 3,5% de poliacrilamida, preparado em tampão acetato de potássio 0,25 M, pH 6,8. O gel de separação encerrava 12,5% de acrilamida, preparado em tampão acetato de potássio 1,5 M, pH 4,3, utilizando glicerol 50% no lugar da água. A solução utilizada nas câmaras catódica e anódica foi tampão β -Alanina-ácido acético, pH 4,5. A amostra (2,5 mg/mL) foi dissolvida em tampão acetato de potássio 0,25 M, pH 6,8 e, após a centrifugação a 10.000 x g, por 5 minutos, foram adicionados cristais de glicina e azul de metileno 0,1%. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical, onde os géis foram submetidos a uma voltagem de 150 V e amperagem de 30 mA. As bandas protéicas foram visualizadas através da coloração por *Coomassie Brilliant Blue R-250*, tal como descrito anteriormente.

5.2.4 Detecção de Glicoproteína em Gel

A determinação de carboidratos presentes na estrutura de Mo-CBP₄ foi avaliada por meio de eletroforese na presença de SDS, cujo gel foi revelado pelo método do Ácido Periódico de Schiff (PAS), descrito por Zacharius *et al.* (1969). Os géis e a amostra foram preparados como descrito no item “5.2.1”, bem como as condições de corrida utilizadas. Ao término da corrida, o gel foi embebido em uma solução fixadora de ácido acético a 7,5% e, após 1 hora, foi transferido para uma solução de ácido periódico a 0,2%, na qual permaneceu por 45 minutos, a uma temperatura de 4 °C. Em seguida, o gel foi corado com o reagente de Schiff (Sigma), a 4 °C, por mais 45 minutos. O descoramento foi realizado com uma solução de matabissulfito de potássio 0,5% em HCl 0,05 M.

5.2.5 Quantificação de Carboidratos Totais

A análise de carboidratos totais foi realizada seguindo a metodologia descrita por Dubois *et al.* (1956), modificada por Masuko *et al.* (2005). Em microplacas com 50 µL de solução de Mo-CBP₄ (3 mg/mL), foram adicionados 150 µL de ácido sulfúrico concentrado e 30 µL de fenol 5% (p/p). Após a adição dos reagentes, a placa foi aquecida em banho-maria por 5 minutos a 90 °C. Após resfriada a solução, as leituras foram realizadas em leitor de ELISA a 492 nm. A concentração de carboidratos totais foi estimada através de uma curva padrão a partir de concentrações conhecidas de um açúcar padrão (galactose).

5.2.6 Determinação de Atividade Hemaglutinante

Para determinação de atividade hemaglutinante, foi utilizada a metodologia citada por Moreira e Perrone (1977). Solução de Mo-CBP₄ (1 mg/mL) foi submetida a diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, etc) em tubos de ensaio, na presença de NaCl 0,15 M. A 200 µL de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias (2%), provindas de coelho e humano (A, B e O), tratadas ou não com tripsina. Os tubos foram incubados a 37 °C, 30 minutos, deixados em repouso por mais 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados a 3.000 x g, 30 segundos, temperatura

ambiente. A visualização dos aglutinados foi feita a olho nu e os resultados foram expressos em unidade de hemaglutinação (UH), definida como o inverso da maior diluição da amostra ainda capaz de aglutinar hemácias.

A técnica utilizada para tratamento enzimático dos eritrócitos foi descrita por Lis e Sharon (1972). Inicialmente, amostras contendo 1 mL de sangue foram lavadas três vezes com NaCl 0,15 M e, em seguida, tripsina foi adicionada na proporção de 0,1 mg de enzima para 10 mL da suspensão de eritrócitos 2%. Essa suspensão foi incubada por 1 hora, 4 °C, sob agitação ocasional e centrifugada a 3.000 x g, 5 minutos. Os eritrócitos tratados foram novamente lavados com NaCl 0,15 M (6 vezes) e o “pellet” de células resultante, suspenso em um volume de NaCl 0,15 M, suficiente para obtenção de hemácias a 2%.

5.2.7 Determinação de Atividade Coagulante

Sabendo-se que muitas proteínas isoladas de sementes de *M.oleifera* são capazes de coagular material em suspensão, foi avaliada a atividade coagulante de Mo-CBP₄. A metodologia utilizada foi a mesma descrita por Ghebremichael *et al.* (2005), na qual a turbidez da água é medida pela absorbância a 500 nm. Inicialmente, a suspensão de argila foi preparada adicionando-se 5 g de argila a 100 mL de água, sob agitação contínua por 15 minutos. Suspensões de alta ou baixa turbidez foram obtidas deixando a suspensão decantar em bancada por 1 hora ou aproximadamente 12 horas, respectivamente. A 2 mL do sobrenadante, em cubetas de plástico, foram adicionados 10 µL de uma solução de Mo-CBP₄ (10 mg/mL). O mesmo foi válido para o controle positivo: sulfato de alumínio e potássio (10 mg/mL); e controles negativos: água e albumina sérica bovina (10 mg/mL). Os testes foram realizados para alta (absorbância inicial de 1.919) e baixa (absorbância inicial de 0.524) turbidez e um gráfico comparativo de absorbâncias foi gerado a partir dos dados resultantes. Ao final do experimento, as cubetas contendo a suspensão de argila com a amostra teste e controles foram fotografadas.

5.2.8 Avaliação da Digestibilidade *in vitro* de Mo-CBP₄

5.2.8.1 Digestibilidade *in vitro* de *Mo*-CBP₄ – Enzimas individuais

A metodologia utilizada para digerir as frações *in vitro* foi baseada na técnica descrita por Sathe (1993).

Inicialmente, foi realizada a digestão utilizando pepsina. A 200 µL de uma solução de *Mo*-CBP₄ (2 mg/mL), em HCl 0,1 M, pH 1,78, foram adicionados 40 µL de solução de pepsina (1,0 mg/mL), preparada também em HCl 0,1 M, pH 1,78, equivalendo a uma relação enzima/proteína de 1:10. Após estabilização a 37 °C, alíquotas de 25 µL foram retiradas nos tempos de zero, 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas. A cada alíquota foi acrescentado tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 2%) duas vezes concentrado, seguido do aquecimento a 100 °C, por 10 minutos. Albumina sérica bovina, na mesma proporção e condições da amostra teste, foi utilizada como controle da ação catalítica, porém as alíquotas foram coletadas no tempo zero e 2 horas do início da digestão.

Foi realizada também a digestão pelas enzimas tripsina e quimotripsina, geralmente encontradas no intestino de animais monogástricos. A metodologia utilizada obedeceu à mesma sequência descrita para o tratamento enzimático com pepsina, modificando-se, além das enzimas, o tampão utilizado (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1, em lugar de HCl 0,1 M).

Para verificar o grau de hidrólise enzimática das proteínas nos diferentes tempos de exposição, foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida (15%), de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). A quantidade de proteína aplicada nos poços foi de 5 µg e as bandas protéicas foram visualizadas através da coloração por *Coomassie Brilliant Blue R-250*, tal como descrito anteriormente.

5.2.8.2 Digestibilidade *in vitro* de *Mo*-CBP₄ - Forma Seqüencial

Para avaliar a digestibilidade de *Mo*-CBP₄ de maneira seqüencial, amostra de 1,0 mg da proteína foi dissolvida em 500 µL de solução de pepsina (0,2 mg/mL dissolvidos em HCl 0,1 M, pH 1,78), permanecendo incubada a 37 °C, por 2 horas. Ao término desse período, foram retirados 250 µL de amostra

e acrescidos, imediatamente, de tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 2%) duas vezes concentrado, seguido de aquecimento a 100 °C, por 10 minutos. Aos 250 µL restantes, foram acrescidos 250 µL de uma solução contendo tripsina e quimotripsina (0,2 mg/mL dissolvido em Tris-HCl 0,25 M, pH 8,91), mantida a 37 °C, por 3 horas. As soluções enzimáticas foram preparadas de forma a proporcionar uma relação enzima/proteína de 1:10. Ao término das 3 horas, à alíquota de 250 µL foi adicionado, imediatamente, tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 2%) duas vezes concentrado, sendo aquecida a 100 °C, por 10 minutos. Como controle de ação catalítica das enzimas, albumina sérica bovina foi digerida na mesma proporção e condições da amostra teste. Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%), seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970), foi utilizada para verificar o grau de hidrólise das proteínas.

5.3 Atividades Antinociceptiva e Anti-inflamatória de *Mo*-CBP₄

5.3.1 Atividade Antinociceptiva

O modelo escolhido para avaliação da atividade antinociceptiva foi aquele descrito por Koster, Anderson e De Beer (1959), que consiste em observar contorções abdominais, acompanhadas por extensão dos membros inferiores, após injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,8% em camundongos.

Inicialmente foi testada a fração protéica P_{NAG}, por conter as proteínas retidas em coluna de quitina eluídas estritamente por competição pelo sítio de ligação. Camundongos Swiss machos, com massa corpórea entre 25 e 35 g, previamente aclimatados, foram separados em 2 grupos (6 animais/grupo), sendo um controle e um experimental. O grupo controle foi tratado com solução salina 0,9% (0,1 mL/10 g de massa corpórea, via i.p.) e o grupo experimental com solução de P_{NAG} em salina 0,9% na dose de 35 mg/kg de peso corpóreo (via i.p.). Trinta minutos depois as contorções abdominais foram induzidas através de administração de ácido acético 0,8% (0,1 mL/10 g de massa corpórea, via i.p.). Depois de dez minutos, as contorções foram contadas durante 20 minutos. Em seguida, o mesmo procedimento foi realizado, porém,

ao grupo experimental foi administrado *Mo*-CBP₄ purificada, ressuspensa em salina 0,9%, na dose de 35 mg/kg de peso corpóreo, via i.p.

Para obtenção da curva dose resposta foram injetadas, via i.p., soluções de *Mo*-CBP₄ nas doses de 1, 3,5 ou 10 mg/kg de massa corpórea, onde os grupos controle foram salina 0,9% e indometacina dissolvida em salina 0,9% na dose de 10 mg/kg de massa corpórea. Trinta minutos após a administração das soluções testes, foi administrado ácido acético 0,8%, via i.p. (0,1 mL/10 g de massa corpórea). As contorções abdominais foram contadas durante 20 minutos, iniciando-se dez minutos após a administração do ácido acético.

Utilizando o mesmo modelo experimental, foi testada a atividade antinociceptiva de *Mo*-CBP₄ administrada oralmente (v.o.). Para tal, os animais, previamente aclimatados, foram separados em 3 grupos (n = 6): um controle e dois experimentais. O grupo controle recebeu, 30 minutos antes da indução com o ácido acético, solução salina 0,9% (0,1 mL/10 g de massa corpórea, v.o.). Aos grupos experimentais foram administrados, oralmente, *Mo*-CBP₄ na dose de 10 mg/kg de massa corpórea (escolhido por ter sido a dose com maior inibição de contorções abdominais via i.p.), 30 ou 60 minutos antes da indução das contorções por ácido acético. Os dados experimentais obtidos foram expressos como o número total de contorções abdominais e o grau de inibição foi expresso pela diferença entre a resposta obtida nas doses de *Mo*-CBP₄ e o grupo controle, sendo esses valores mostrados em termos percentuais.

5.3.2 Atividade Anti-inflamatória

Para avaliação da atividade anti-inflamatória de *Mo*-CBP₄, foram usados o modelo de permeabilidade vascular e migração de leucócitos induzidos por ácido acético.

5.3.2.1 Permeabilidade Vascular Induzida por Ácido Acético

O efeito de *Mo*-CBP₄ sobre o aumento da permeabilidade vascular induzido por ácido acético foi avaliado de acordo com a metodologia descrita por Whittle (1964), medindo-se o extravasamento do corante azul de Evans a partir do compartimento vascular para dentro da cavidade peritoneal.

Camundongos Swiss machos, previamente aclimatados, foram separados em grupos controle e experimentais (6 animais/grupo). A todos foi administrado azul de Evans, via endovenosa (5 mg/mL; dose de 0,1 mL/10 g de massa corpórea). Trinta minutos após a aplicação do corante, foram administrados, no grupo controle, salina 0,9 % (0,1 mL μ L/10 g de massa corpórea; i.p.) e nos grupos experimentais, *Mo*-CBP₄ nas doses de 1, 3,5 ou 10 mg/kg de massa corpórea, via i.p. Trinta minutos após os tratamentos, ácido acético 0,8 % (0,1 mL/10 g de massa corpórea) foi injetado via i.p., sendo registrado o número de contorções abdominais como descrito anteriormente. Os camundongos foram sacrificados através de inalação por halotano e tiveram suas cavidades peritoneais lavadas com 2,5 mL de salina heparinizada (heparina 5 U/L), para obtenção do lavado peritoneal, que foi centrifugado a 1.000 rpm por 10 minutos seguida da determinação da absorbância a 610 nm. A medida da concentração do corante no lavado foi determinada utilizando-se uma curva padrão do corante azul de Evans. Os dados experimentais obtidos foram expressos como concentração de azul de Evans (μ g/mL de lavado) e o grau de inibição foi obtido pela diferença entre as respostas obtidas nas doses de *Mo*-CBP₄ e o grupo que recebeu apenas salina.

5.3.2.2 Migração de Leucócitos Induzida por Ácido Acético

Para avaliar o efeito de *Mo*-CBP₄ sobre a migração leucocitária induzida por ácido acético, animais, previamente aclimatados, foram separados em quatro grupos: um controle e três experimentais (CARBONERO *et al.*, 2008).

Trinta minutos antes da administração do agente inflamatório, os animais foram tratados com salina 0,9% (0,1 mL/10 g de massa corpórea; i.p.) ou *Mo*-CBP₄ nas doses de 1, 3,5 ou 10 mg/kg (0,1 mL/10 g de massa corpórea; i.p.). Após 30 minutos da administração do ácido acético 0,8% (0,1 mL/10 g de massa corpórea; i.p.), os camundongos foram sacrificados através de inalação de halotano e tiveram suas cavidades peritoneais lavadas com 1,5 mL de salina heparinizada (heparina 5 U/L). A contagem total de leucócitos foi realizada conforme metodologia descrita por Souza e Ferreira (1985). Nesse procedimento, o lavado peritoneal coletado de cada animal foi diluído em reagente de Türk (1:20) e, posteriormente, usado para a contagem total de

leucócitos em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. do número de células $\times 10^4/\text{mm}^3$ de fluido peritoneal.

5.3.3 Avaliação das Atividades Antinociceptiva e Anti-inflamatória de *Mo*-CBP₄ após Incubação com *N*-Acetil-*D*-Glucosamina

Para avaliar a ligação entre o sítio de interação ao carboidrato e as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de *Mo*-CBP₄, esta foi previamente incubada com uma solução de *N*-acetil-*D*-glucosamina (NAG) 0,1 M durante 30 minutos a 37°C.

Os animais previamente aclimatados foram separados em 4 grupos. Os grupos foram tratados com salina 0,9%, salina 0,9% com NAG 0,1 M, *Mo*-CBP₄ (10 mg/kg) com NAG 0,1 M ou *Mo*-CBP₄ (10 mg/kg), via i.p. Ácido acético (0,8%; 0,1 mL/10 g de massa corpórea) foi administrado após trinta minutos do tratamento. Passados 10 minutos, as contorções foram contadas por um período de 20 minutos. Os animais foram, então, sacrificados e tiveram suas cavidades peritoneais lavadas com 1,5 mL de salina heparinizada (heparina 5 U/L). A contagem total de leucócitos foi realizada conforme metodologia descrita anteriormente.

5.3.4 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. (erro padrão da média). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste de Dunnett e t-Student utilizando o programa *Graphpad Prism*, v. 5.0. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Purificação de uma Proteína Ligante a Quitina a Partir de Sementes de *M. oleifera*

O extrato total obtido apresentou uma quantidade de proteínas correspondente a $216,44 \pm 4,72$ mg/gF (TABELA 02). Do extrato total, através de diálise exaustiva contra água e centrifugação, foi obtida a fração albumínica contendo um teor de proteína de $144,71 \pm 1,74$ mg/gF, o que corresponde 66,85% das proteínas do extrato total. Devido ao grande volume da fração albumínica, foi procedida sua concentração com sulfato de amônio (fração 0-90%), onde o rendimento protéico foi de $122,33 \pm 2,04$ mg/gF, representando 56,47% das proteínas do extrato total.

Com a finalidade de obter proteínas ligantes a quitina a partir da fração 0-90%, foi realizada uma cromatografia de afinidade em coluna de quitina. A FIGURA 06 mostra o perfil cromatográfico após eluição com *N*-acetil-*D*-glucosamina 0,1 M e ácido acético 0,05 M para obtenção das frações protéicas P_{NAG} e P_{AC} respectivamente. P_{NAG}, que teve um rendimento protéico em massa de $6,50 \pm 0,38$ mg/gF, foi utilizado para o próximo passo cromatográfico, por ter sido eluído por afinidade e não por mudança de pH, como aconteceu com o P_{AC}.

Os picos obtidos através da cromatografia em matriz de troca iônica Resource S acoplada ao FPLC, foram chamados de *Mo*-CBP (*Mo*: *Moringa oleifera*; CBP: *chitin-binding protein*), com números subscritos de 1 a 5 de acordo com a ordem de eluição (FIGURA 07).

Conforme já mencionado na seção “Métodos”, após liofilização, *Mo*-CBP₄ mostrou-se como o pico com maior rendimento (TABELA 02). Assim sendo este foi escolhido para caracterização bioquímica e avaliação de suas propriedades biológicas, em particular atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.

Tabela 02. Etapas de purificação de *Mo-CBP₄*, com os respectivos teores e rendimentos protéicos

Etapas ^a	Proteína (mg/gF) ^b	Rendimento (%) ^c
Extrato total	216,44 ± 4,72	100,0
Fração albumínica	144,71 ± 1,74	66,85
F 0-90% [(NH ₄) ₂ SO ₄]	122,33 ± 2,04	56,47
P _{NAG} ^d (Quitina)	6,50 ± 0,38	3,00
<i>Mo-CBP₄</i> ^e (Resource S)	1,17 ± 0,07	0,54

Os resultados representam a média ± desvio padrão de seis experimentos similares.

^a Etapas de purificação.

^b Quantidade total de proteína recuperada (mg) em cada etapa de purificação por grama de farinha de sementes de *Moringa oleifera*.

^c Recuperação de proteína em cada etapa de purificação, considerando aquela determinada no extrato total como sendo 100%.

^d Fração protéica ligante a quitina eluída com *N*-acetil-D-glucosamina.

^e Proteína retida de Resource S, eluída com tampão acetato de sódio 0,05 M contendo NaCl 0,6 M.

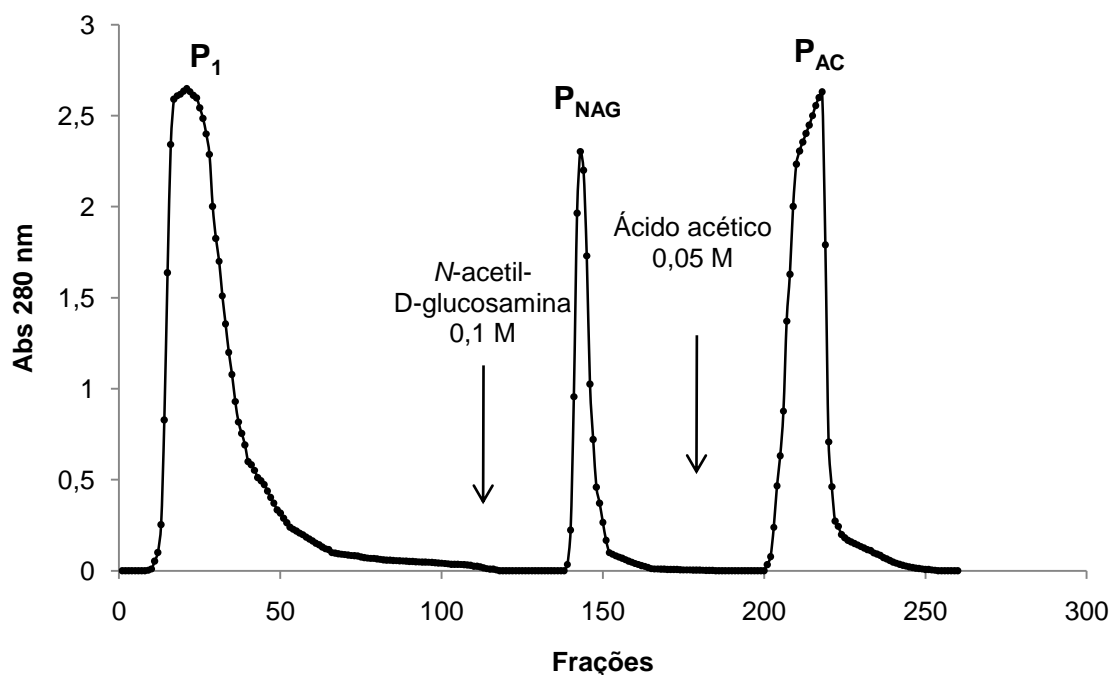


Figura 06. Perfil cromatográfico obtido após aplicação da fração albumínica de sementes de *M. oleífera* em matriz de quitina. A fração albumínica das sementes (575 mg de proteína) foi aplicada em matriz de quitina (3,5 x 20,0 cm) previamente equilibrada com Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. P₁ corresponde às proteínas não retidas eluídas com o tampão de equilíbrio. P_{NAG} e P_{AC} representam as proteínas retidas na matriz de quitina, eluídas com *N*-acetil-D-glucosamina 0,1 M e ácido acético 0,05 M, respectivamente. Frações (2,2 mL) foram coletadas em um fluxo de 60 mL/h e as proteínas eluídas foram monitoradas em absorbância a 280 nm.

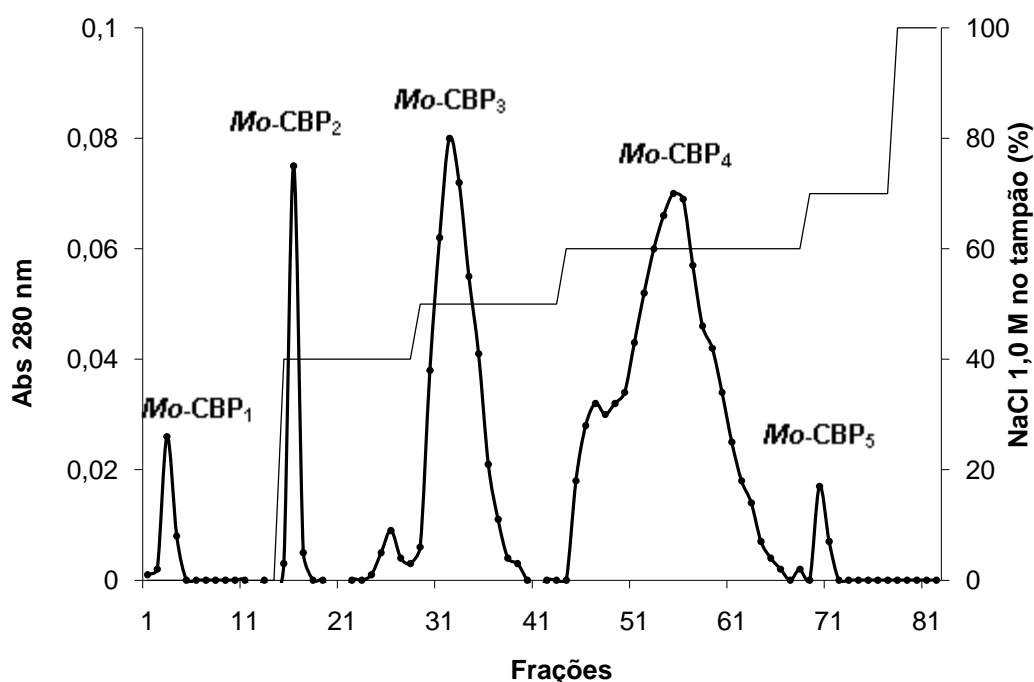


Figura 07. Perfil cromatográfico obtido após aplicação de P_{NAG} em matriz de Resource S acoplada ao sistema de FPLC. A fração protéica eluída da coluna de quitina com *N*-acetil-D-glucosamina 0,1 M (P_{NAG}; 15 mg de proteína) foi aplicada em Resource S (6,4 mm x 30 mm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. *Mo*-CBP representam as proteínas ligantes à quitina purificadas das sementes de *Moringa oleifera*. *Mo*-CBP₁ corresponde às proteínas não retidas na matriz Resource S, eluídas com o tampão de equilíbrio. *Mo*-CBP₂, *Mo*-CBP₃, *Mo*-CBP₄ e *Mo*-CBP₅ representam as proteínas retidas, que foram eluídas com o tampão de equilíbrio acrescido de 40, 50, 60, ou 70% de NaCl 1 M, respectivamente. Frações (2,0 mL) foram coletadas em um fluxo de 60 mL/h e as proteínas eluídas foram monitoradas em absorbância a 280 nm.

6.2 Caracterização Bioquímica de *Mo*-CBP₄

O perfil eletroforético de *Mo*-CBP₄ sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida 15% mostra que, na ausência de agente redutor (raia 2), *Mo*-CBP₄ apresentou-se em duas bandas protéicas: uma de massa molecular aparente de 27,5 kDa e outra de 16,5 kDa. Já na presença de 2-mercaptoetanol (2%) e aquecimento a 100 °C, por 10 minutos (raia 3), foi verificada uma única banda com massa molecular aparente de 9,8 kDa (FIGURA 08).

Por eletroforese bidimensional, foram obtidos dois “spots” de massas moleculares aparentes de 18,7 e 13,4 kDa com mesmo ponto isoelétrico, 10,55 (FIGURA 09).

Devido a *Mo*-CBP₄ ser uma proteína extremamente básica, a eletroforese nativa só foi possível com o protocolo para gel ácido, apropriado para proteínas básicas. O perfil eletroforético não foi muito diferente em relação àquele encontrado para condições desnaturantes, tendo sido visualizadas também duas bandas protéicas (FIGURA 10).

A natureza glicídica de *Mo*-CBP₄ foi verificada em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes revelada pelo método do ácido periódico de Schiff (FIGURA 11). *Mo*-CBP₄ portou-se como uma glicoproteína possuindo um teor de carboidrato de 2,85%.

Apesar de *Mo*-CBP₄ ter a capacidade de se ligar a quitina (carboidrato), no ensaio de hemaglutinação não foi visualizada aglutinação de eritrócitos de coelho nem de humanos (tipos A, B e O), mesmo quando estes foram tratados com tripsina.

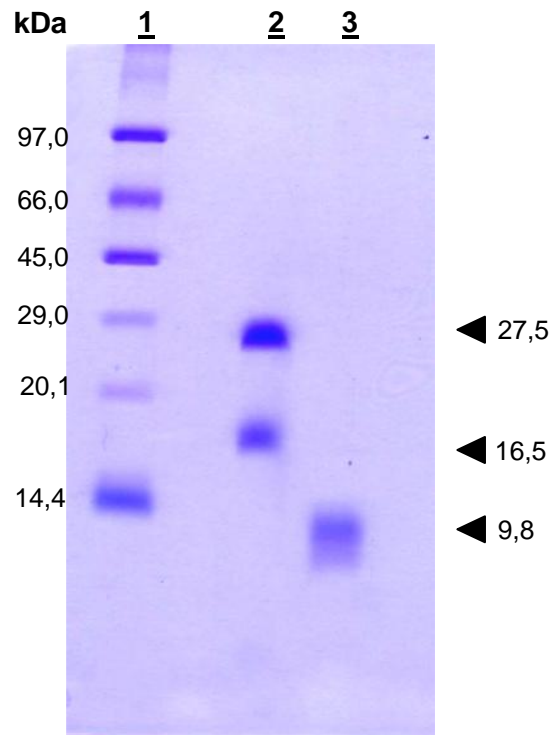


Figura 08. Eletroforese de $Mo-CBP_4$ em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes. Amostras de $Mo-CBP_4$ (5 μ g de proteína), preparadas em tampão de amostra, foram aplicadas em gel de poliacrilamida 15%. Raia 1 - marcadores de massa molecular; Raias 2 e 3 – $Mo-CBP_4$ em condições não-redutora e redutora (2-mercaptoetanol), respectivamente. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,25%.

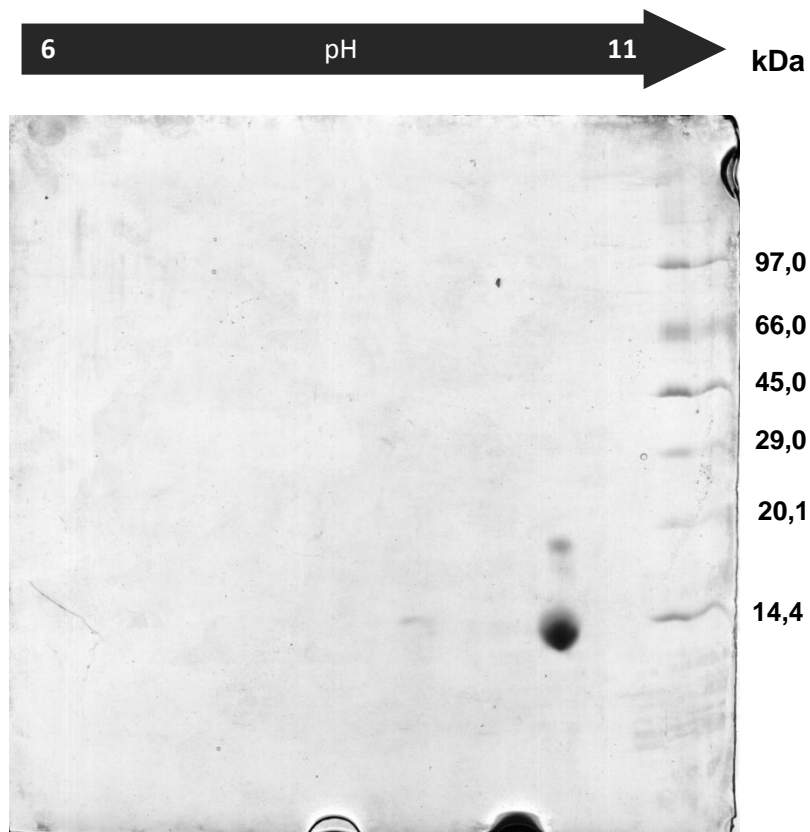


Figura 09. Eletroforese bidimensional de *Mo-CBP*₄. Os marcadores de massa molecular estão assinalados à direita do gel de poliacrilamida (15%). As amostras foram submetidas à focalização isoeétrica em tiras de 11 cm com gradiente de pH 6-11 e o gel foi corado com Coomassie coloidal.



Figura 10. Eletroforese de *Mo-CBP*₄ em gel de poliacrilamida em condições nativas para proteínas básicas. Amostra de *Mo-CBP*₄ (5 µg de proteína), preparada em tampão de amostra, foi aplicada em gel de poliacrilamida 12,5%. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

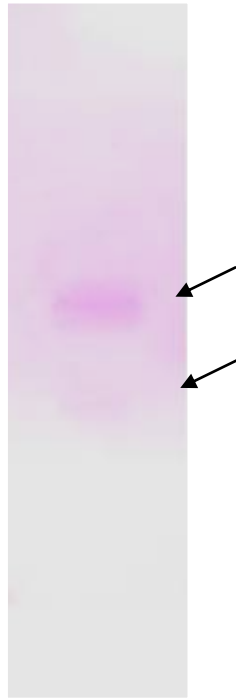


Figura 11. Eletroforese de *Mo-CBP*₄ em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes para identificação de carboidrato. Amostra de *Mo-CBP*₄ (5 µg de proteína), preparada em tampão de amostra, foi aplicada em gel de poliacrilamida 15%. O gel foi corado com ácido periódico de Schiff.

Na investigação de atividade coagulante de *Mo-CBP₄* (FIGURA 12), os controles água e BSA adicionados à suspensão de argila permaneceram com a absorvância basicamente inalterada durante as 2 horas de experimento, sendo lenta a sedimentação, tanto para alta (A) como para baixa (B) turbidez. Já o sulfato de alumínio e potássio (controle positivo) apresentou uma constante queda na absorvância, até chegar a aproximadamente zero nos dois experimentos. *Mo-CBP₄* foi capaz de coagular material em suspensão já nos primeiros 15 minutos, sendo que o efeito foi melhor para água de baixa turbidez do que alta turbidez, apresentando perfil semelhante àquele obtido com sulfato de alumínio e potássio.

A fotografia das cubetas (FIGURA 13), contendo os controles e a amostra-teste, mostra que não há diferença a olho nu entre a suspensão tratada com *Mo-CBP₄* ou sulfato de alumínio e potássio.

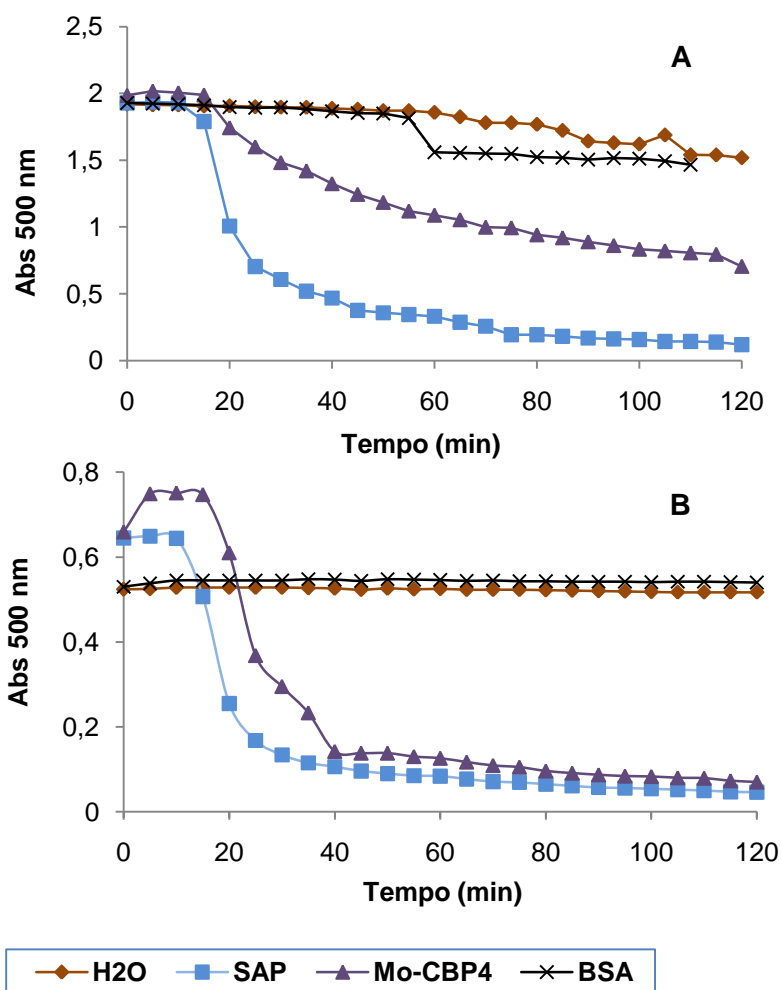


Figura 12. Atividade coagulante de *Mo-CBP*₄. Dez microlitros de uma solução de *Mo-CBP*₄ (10 mg/mL) foram adicionados a 2 mL de água com alta (A) e baixa (B) turbidez. Como controle negativo e positivo foram utilizados albumina sérica bovina (BSA) e sulfato de alumínio e potássio (SAP), respectivamente, ambos na mesma concentração de *Mo-CBP*₄. A atividade foi medida por meio de monitoramento da absorbância a 500 nm, a cada 5 minutos, por 2 horas.

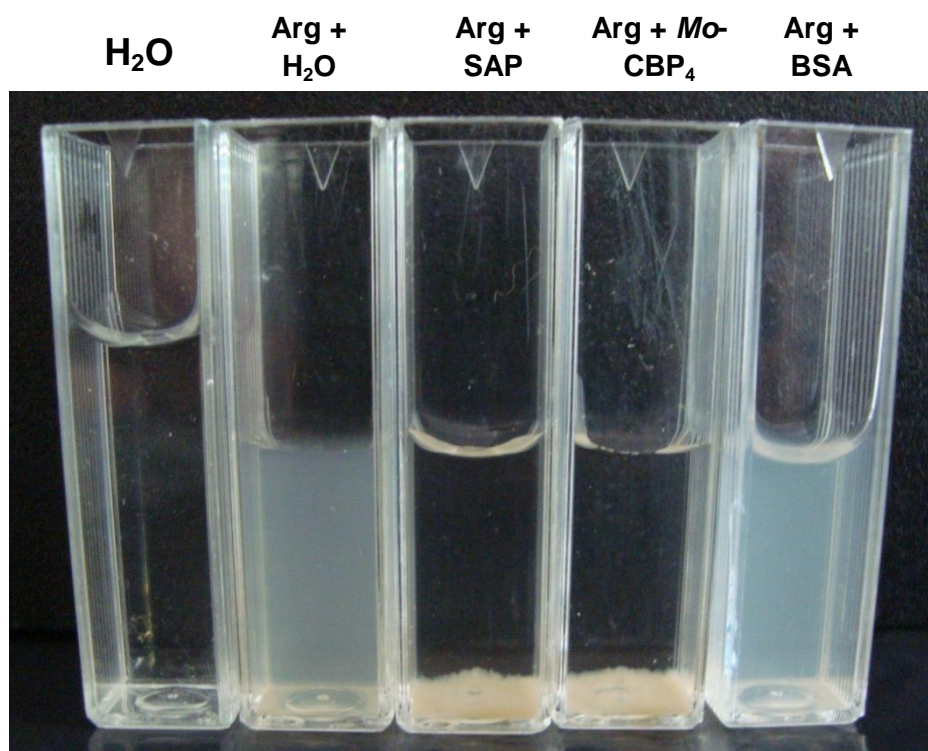


Figura 13. Fotografia ilustrativa da atividade coagulante de *Mo-CBP₄*. Cubetas que continham 2 mL de H_2O ou suspensão de argila (água de baixa turbidez), após 2 horas de adição de controles (H_2O , BSA e SAP 10 mg/ml) e amostra teste (*Mo-CBP₄*). Legenda: Arg: argila; SAP: sulfato de alumínio e potássio; “BSA”: albumina sérica bovina.

A digestibilidade *in vitro* de *Mo-CBP₄* foi realizada utilizando enzimas digestivas encontradas no trato digestório de animais monogástricos.

Mo-CBP₄ foi posta em contato com pepsina, nas condições ideais para hidrólise enzimática. A albumina sérica bovina (BSA), utilizada como um controle positivo, foi totalmente digerida, garantindo assim que a pepsina se encontrava na forma ativa. Entretanto, *Mo-CBP₄* não foi digerida, mesmo depois de 6 horas em contato com a enzima, já que se mostrou como duas bandas no gel de eletroforese 15% em condições desnaturantes (FIGURA 14).

Mo-CBP₄ foi posta em contato com tripsina e quimotripsina separadamente, nas condições ideais para hidrólise enzimática. A albumina sérica bovina (BSA) foi digerida, pois a intensidade de sua banda diminuiu depois das 4 h em contato com as enzimas. Já *Mo-CBP₄* foi apenas parcialmente digerida ao longo do experimento (FIGURA 15).

Foi realizada, também, a digestão como ocorre no seu curso fisiológico, ou seja, de forma seqüencial, utilizando-se primeiro a pepsina (estômago), seguida de tripsina e quimotripsina (intestino). O perfil eletroforético (FIGURA 16) mostra que enquanto BSA foi totalmente digerida, *Mo-CBP₄* se mostrou resistente à degradação proteolítica.

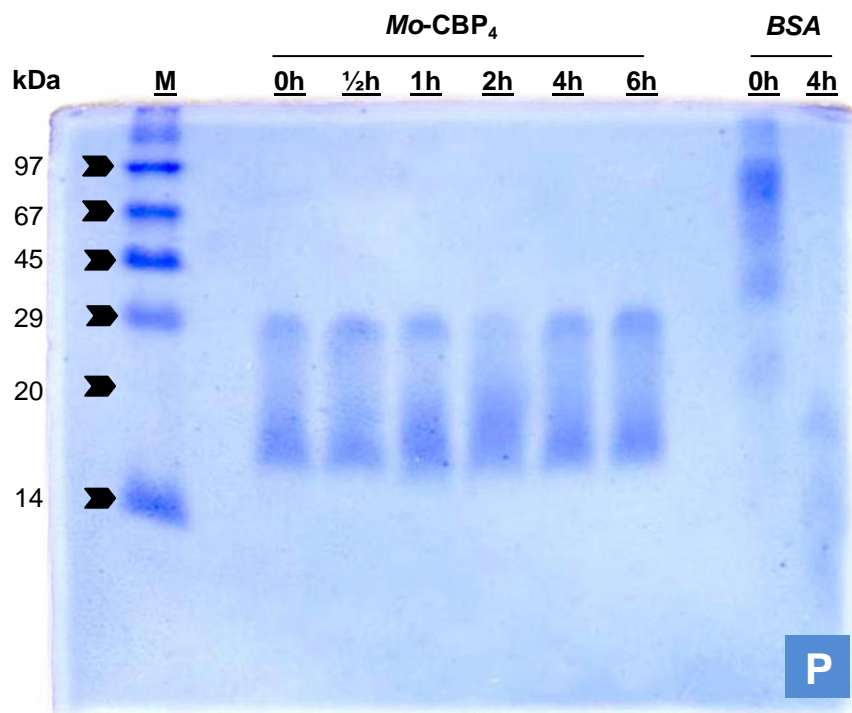


Figura 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%; PAGE-SDS) de *Mo-CBP₄* submetida à digestão por pepsina. *Mo-CBP₄* foi dissolvida em HCl 0,1 M, pH 1,78, e posta em contato com pepsina (P) a 37 °C (enzima/proteína: 1:10). Alíquotas retiradas em diversos tempos (h) foram submetidas à PAGE-SDS e coradas com *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,25%. Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como controle. A quantidade de proteína aplicada por poço foi de 5 µg. “M”: marcadores de massa molecular.

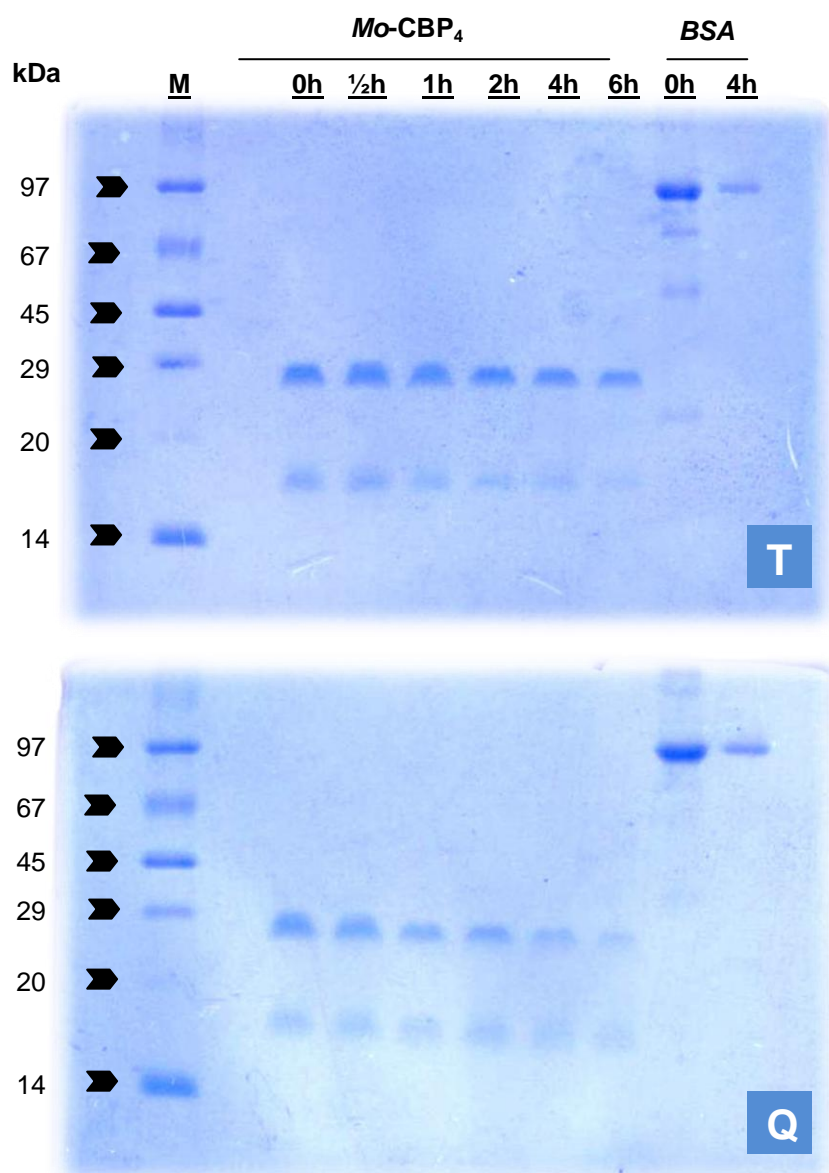


Figura 15. Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%; PAGE-SDS) de *Mo-CBP₄* submetida à digestão por tripsina ou quimotripsina. *Mo-CBP₄* foi dissolvida em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1, e posta em contato com tripsina (T) ou quimotripsina (Q) a 37 °C (enzima/proteína: 1:10). Alíquotas retiradas em diversos tempos (h) foram submetidas à PAGE-SDS e coradas com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como controle. A quantidade de proteína aplicada por poço foi de 5 µg. “M”: marcadores de massa molecular.

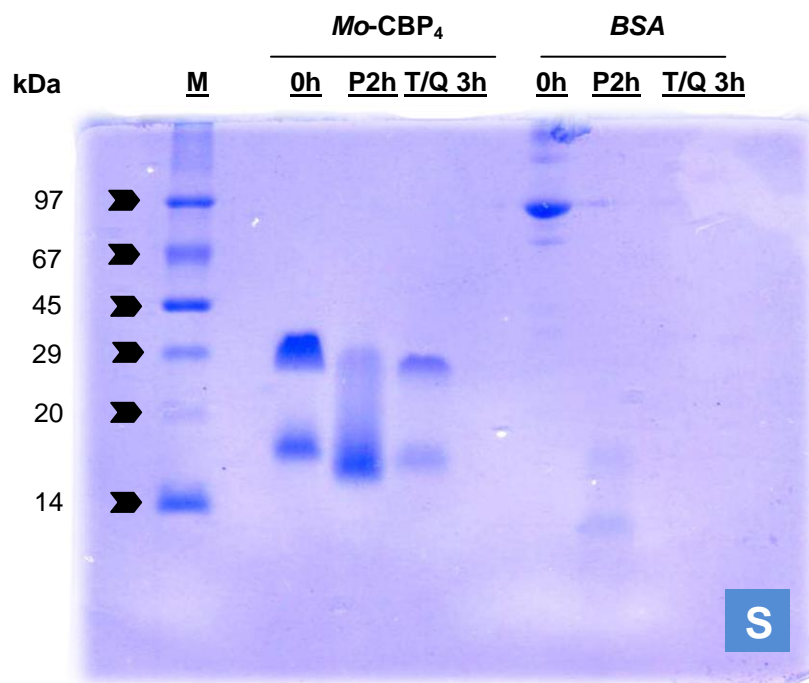


Figura 16. Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%; PAGE-SDS) de *Mo-CBP₄* submetida à digestão seqüencial (S). *Mo-CBP₄* foi posta em contato com uma solução de pepsina (enzima/proteína: 1:10). Após 2 h alíquota foi retirada e submetida à PAGE-SDS. O restante foi colocado em contato com solução de tripsina e quimotripsina e, após 3 h, submetido à PAGE-SDS. As bandas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como controle e a razão enzima/proteína foi de 1:10. A quantidade de proteína aplicadas por poço foi de 5 µg. “M”: marcadores de massa molecular; “P2h”: proteína em contato com pepsina por 2 h; “T/Q3h”: proteína em contato com tripsina/quimotripsina por 3 h.

6.3 Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória de *Mo-CBP₄*

6.3.1 Atividade Antinociceptiva

A atividade antinociceptiva foi determinada por teste clássico de analgesia periférica utilizando o modelo de contorções por ácido acético. Primeiramente foi investigada esta atividade na fração protéica eluída de quitina com *N*-acetil-*D*-glucosamina (P_{NAG}). A FIGURA 17-A mostra que P_{NAG} , na dose de 35 mg/kg de peso corpóreo, foi capaz de inibir 66,1% das contorções induzidas por ácido acético. Quando a atividade foi realizada utilizando *Mo-CBP₄* na dose de 35 mg/kg de peso corpóreo (FIGURA 17-B), a inibição chegou a 98,9%, mostrando que a atividade antinociceptiva se concentrou a medida que a proteína foi purificada.

Quando foram utilizadas doses crescentes de *Mo-CBP₄*, a porcentagem de inibição também foi aumentada, mostrando que a atividade antinociceptiva da proteína em questão é de natureza dose-dependente. A dose de 10 mg/kg foi capaz de inibir 98,9% das contorções induzidas por ácido acético, porcentagem maior que a verificada com a indometacina (controle positivo), na mesma dose (FIGURA 18).

Mo-CBP₄ foi capaz de reduzir significativamente o número de contorções abdominais, mesmo quando administrada por via oral, sendo esse efeito ainda mais acentuado (52,9% de inibição das contorções) quando a proteína foi administrada 60 minutos antes da indução do estímulo nociceptivo por ácido acético (FIGURA 19).

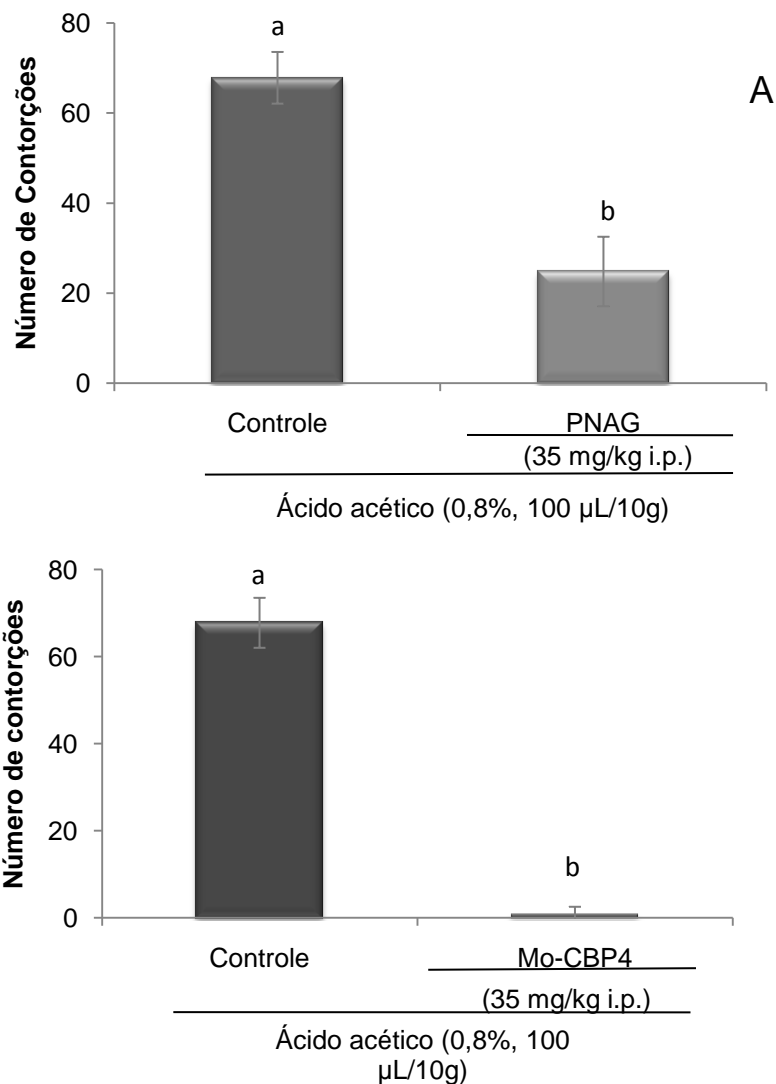


Figura 17. Efeito da administração intraperitoneal de P_{NAG} e $Mo-CBP_4$ sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8% em camundongos. No eixo das abscissas estão apresentados o controle (NaCl 0,15 M) e os grupos experimentais utilizados, ao passo que o eixo das ordenadas representa o número de contorções abdominais determinado em um período de 20 minutos, após 10 minutos da administração de ácido acético 0,8% (v/v) por via intraperitoneal. (A) refere-se ao efeito de P_{NAG} e (B) ao efeito de $Mo-CBP_4$ sobre as contorções abdominais. As colunas verticais representam a média \pm desvio padrão de 6 animais. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelos testes de Dunnett e t-Student.

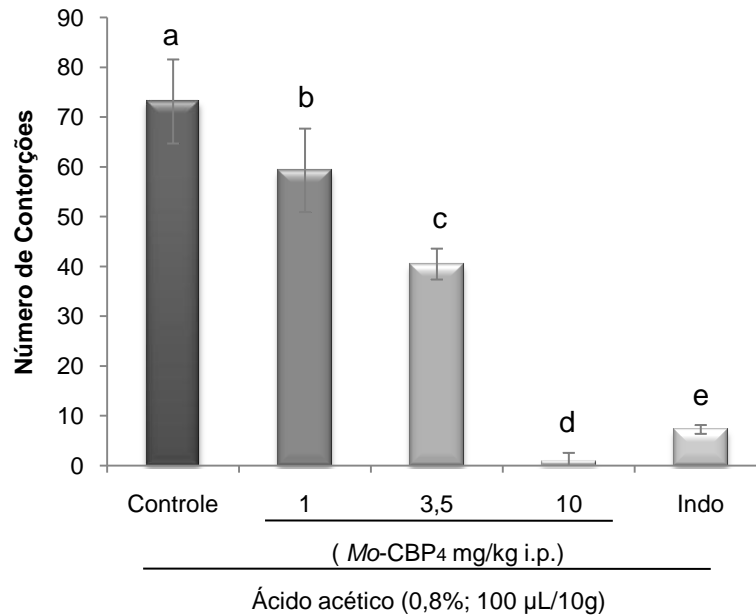


Figura 18. Efeitos da administração i.p. de *Mo-CBP₄*, em diferentes doses, nas contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8% em camundongos. O eixo das abscissas representa o controle (NaCl 0,15 M) e os grupos experimentais (*Mo-CBP₄* nas doses de 1, 3,5 e 10 mg/kg de peso corpóreo e indometacina na dose de 10 mg/kg de peso corpóreo, 100 µL/10 g), ao passo que no eixo das ordenadas está apresentado o número de contorções abdominais determinado em um período de 20 minutos, após 10 minutos da administração de ácido acético 0,8% (100 µL/10g). As colunas verticais representam a média ± desvio padrão de 6 animais. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelos testes de Dunnett e t-Student.

Tabela 03. Inibição das contorções abdominais induzidas por ácido acético pelo tratamento com P_{NAG} e Mo-CBP₄

Tratamento	Dose (mg/kg)	Número de Contorções	% de Inibição*
Controle (NaCl 0,15M)		73,16 ± 8,44 ^a	0,0
P_{NAG}	35,0	24,80 ± 7,72 ^e	66,1
Mo-CBP₄	35,0	0,80 ± 1,78 ^d	98,9
	1,0	59,33 ± 8,38 ^b	18,9
	3,5	40,50 ± 3,10 ^c	44,6
	10,0	0,80 ± 1,78 ^d	98,9
Indometacina	10,0	7,29 ± 0,89 ^f	90,0

Os resultados representam a média ± desvio padrão do número de contorções de seis animais por grupo.

* O percentual de inibição foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ inibição do grupo} = 100 - \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de contorções do grupo} \times 100}{\text{N}^{\circ} \text{ de contorções do controle}}$$

N^o de contorções do controle

Letras diferentes correspondem a valores que diferiram significativamente (p < 0,05) pelos testes de Dunnett e t-Student.

Tabela 04. Efeito de *Mo*-CBP₄ no número de contorções induzidas por ácido acético, via oral

Tratamento	Tempo (min)	Média do N° de Contorções	% de Inibição
Controle(NaCl 0,15M)	-	73,2 ± 8,4 ^a	-
<i>Mo</i> -CBP ₄ (10 mg/kg)	30	60,0 ± 4,2 ^b	18,0%
	60	34,5 ± 6,3 ^c	52,9%

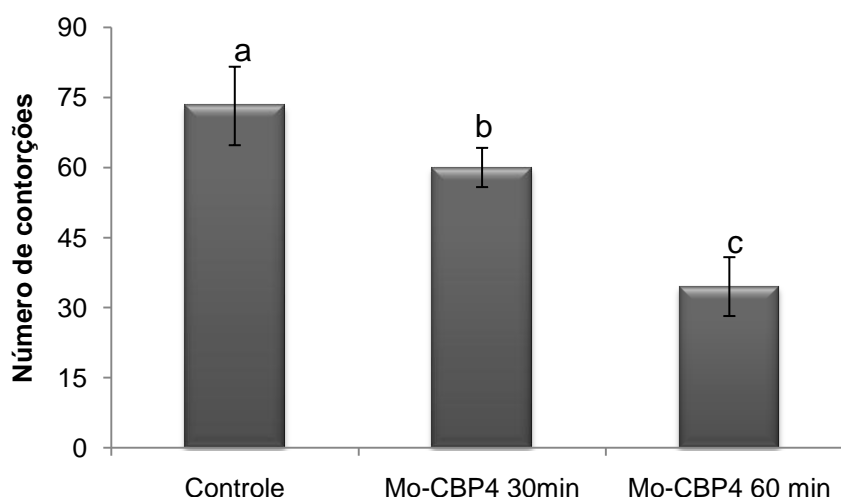


Figura 19. Efeitos da administração oral de *Mo*-CBP₄ (10 mg/kg) sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. No eixo das abscissas estão apresentados o controle (NaCl 0,15 M) e *Mo*-CBP₄ (10 mg/kg de peso corpóreo) administrada pela via oral 30 e 60 minutos antes da administração do ácido acético. O eixo das ordenadas representa o número de contorções abdominais determinado em um período de 20 minutos, após 10 minutos da administração de ácido acético 0,8% (v/v), via intraperitoneal. As colunas verticais representam a média ± desvio padrão de 6 animais. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelos testes de Dunnett e t-Student.

6.3.2 Atividade Anti-inflamatória

Para verificar se *Mo*-CBP₄ possui efeito na permeabilidade vascular, foram utilizadas as doses de 1, 3,5 e 10 mg/kg, usando como controle NaCl 0,15 M. O corante azul de Evans foi administrado endovenosamente para que pudesse ser mensurado o aumento ou diminuição da permeabilidade através do grau de extravasamento deste corante. Como apresentado na FIGURA 20, houve uma diminuição de extravasamento de azul de Evans quando os animais foram pré-tratados com a proteína, mostrando que *Mo*-CBP₄ foi capaz de prevenir o aumento da permeabilidade causada pelo ácido acético. Este efeito foi dose dependente, chegando a uma inibição de 89,1% (TABELA 05) na maior dose.

Para avaliar se *Mo*-CBP₄ exerce algum efeito sobre a migração leucocitária induzida por ácido acético, foram usadas doses de 1, 3,5 e 10 mg/kg da proteína (FIGURA 21). Apesar da proteína não diminuir significativamente a migração leucocitária na menor dose na (1 mg/kg), é evidente a redução deste evento quando os animais foram pré-tratados com as outras doses, chegando a uma porcentagem de inibição de 60,9% na maior dose (TABELA 05).

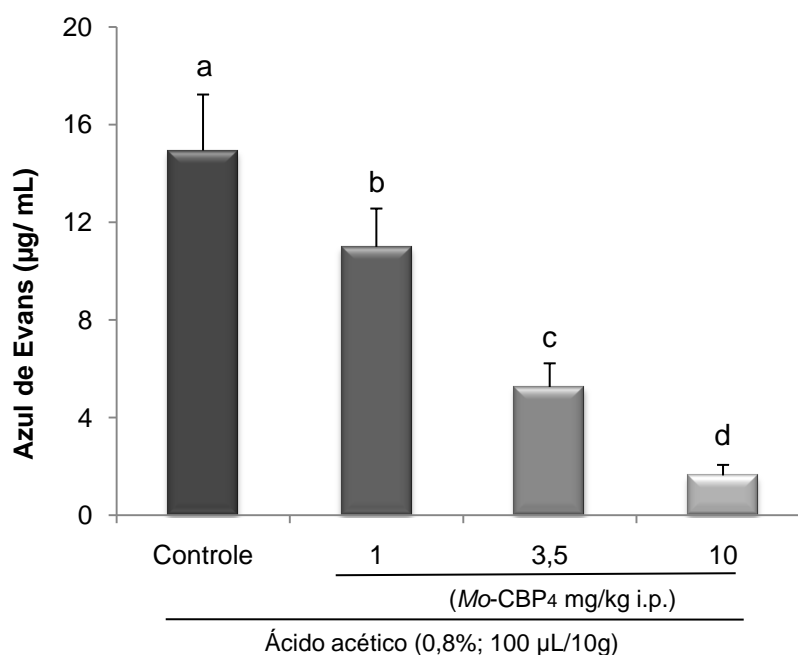


Figura 20. Efeitos da administração i.p. de *Mo-CBP*₄ no sobre o aumento da permeabilidade vascular induzido por ácido acético em camundongos. O eixo das abscissas representa o controle (NaCl 0,15 M) e *Mo-CBP*₄ nas doses de 1, 3,5 e 10 mg/kg de peso corpóreo (100 µL/10 g). No eixo das ordenadas está apresentada a concentração de azul de Evans (µg/mL) obtida a partir do lavado da cavidade intraperitoneal dos animais, coletado 30 minutos após a administração de ácido acético 0,8% (100 µL/10g). As colunas verticais representam a média ± desvio padrão da concentração de azul de Evans de 6 animais. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelos testes de Dunnett e t-Student.

Tabela 05. Efeito de *Mo*-CBP₄ sobre o aumento da permeabilidade vascular e migração leucocitária induzidos por ácido acético em camundongos

Tratamento	Dose (mg/kg)	[AE] [#] (µg/mL)	Nº de Leucócitos (x 10 ⁴)
Controle(NaCl 0,15M)	-	14,94 ± 2,29 ^a	160 ± 28,63 ^a
<i>Mo</i> -CBP ₄	1,0	10,99 ± 1,57 ^b (26,4%)	152 ± 20,2 ^a (5,0%)
	3,5	5,25 ± 0,97 ^c (64,9%)	87,5 ± 3,53 ^b (45,3%)
	10,0	1,63 ± 0,43 ^d (89,1%)	62,5 ± 12,58 ^c (60,9%)

Os resultados representam a média ± desvio padrão do número de contorções de seis animais por grupo.

Os valores entre parênteses correspondem as porcentagens de inibição em relação ao controle. Letras diferentes na mesma coluna correspondem a valores que diferiram significativamente, na mesma coluna, ($p < 0,05$) pelos testes de Dunnett e t-Student.

[#] Concentração do corante Azul de Evans.

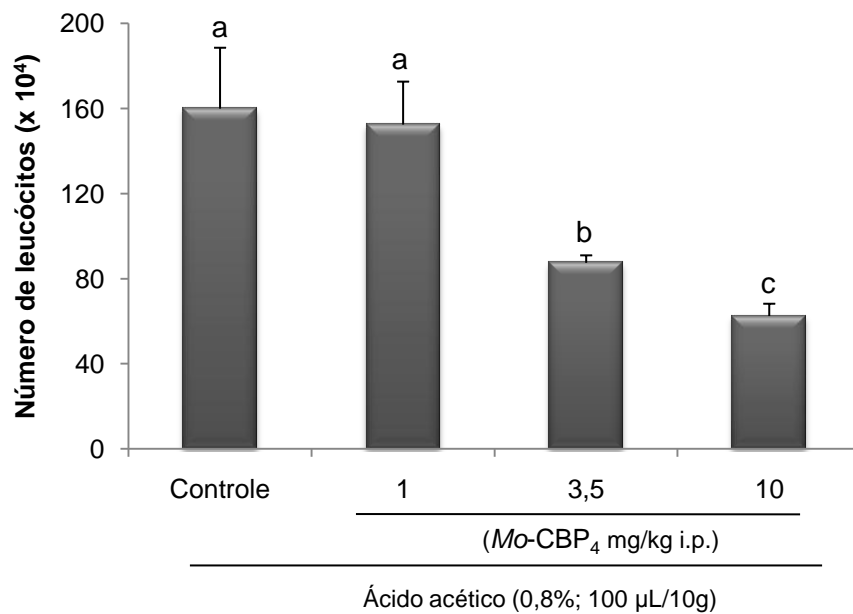


Figura 21. Efeitos da administração i.p. de *Mo-CBP₄* sobre a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por ácido acético 0,8% em camundongos. O eixo das abscissas representa o controle (NaCl 0,15 M) e *Mo-CBP₄* nas doses de 1, 3,5 e 10 mg/kg de peso corpóreo (100 µL/10 g). No eixo das ordenadas está apresentado o número de leucócitos migrados para a cavidade intraperitoneal após 30 minutos da administração de ácido acético 0,8% (100 µL/10g). As colunas verticais representam a média ± desvio padrão do número de leucócitos de 6 animais. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelos testes de Dunnett e t-Student.

6.3.3 Avaliação das Atividades Antinociceptiva e Anti-inflamatória de *Mo*-CBP₄ após Incubação com *N*-Acetil-*D*-Glucosamina

Para avaliar a participação do sítio de interação a carboidrato de *Mo*-CBP₄ nas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, esta proteína foi incubada com uma solução de *N*-acetil-*D*-glucosamina (NAG) 0,1 M durante 30 minutos a 37°C.

A atividade antinociceptiva foi avaliada através do método de indução de contorções abdominais por ácido acético. Como pode ser visualizado na FIGURA 22-A, mesmo incubando *Mo*-CBP₄ com o açúcar, houve inibição das contorções, ou seja, a antinocicepção da proteína parece ser um efeito independente do sítio de ligação ao carboidrato.

Em relação à atividade anti-inflamatória, a avaliação foi realizada através do teste de migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por ácido acético. A incubação com NAG reverteu parcialmente a inibição da migração leucocitária por parte de *Mo*-CBP₄ (FIGURA 22-B).

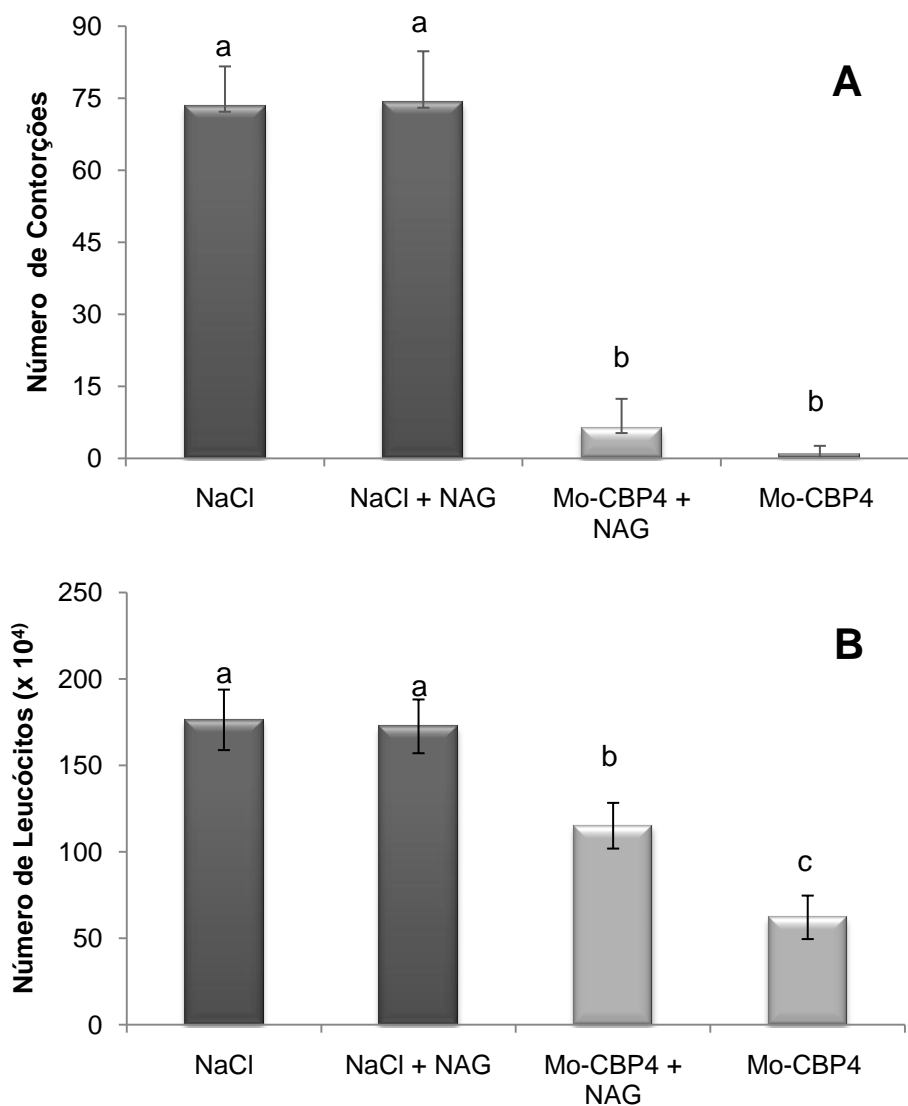


Figura 22. Avaliação do envolvimento do sítio de interação a *N*-acetil-D-glucosamina (NAG) na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Mo*-CBP₄. O eixo das abscissas representa os controles (NaCl 0,15 M e NaCl 0,15 M + NAG 0,1 M) e *Mo*-CBP₄ (10 mg/kg) incubado ou não com NAG 0,1 M. No eixo das ordenadas estão apresentados o número de contorções (A) e o número de leucócitos migrados para a cavidade intraperitoneal (B) após administração de ácido acético 0,8% (100 μ L/10g). As colunas verticais representam a média \pm desvio padrão do número de contorções ou leucócitos de 6 animais. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

7. DISCUSSÃO

Moringa oleifera é uma planta conhecida popularmente pelas suas diversas utilizações, chegando a ser chamada de “árvore milagrosa” (FUGLIE, 1999). Esta planta, que cresce principalmente em países tropicais, parece fornecer suporte às populações mais necessitadas do globo. Quase todas as suas partes possuem grande valor nutricional e farmacológico, e suas sementes têm propriedade purificadora da água, mostrando o grande potencial biotecnológico dessa planta.

Ressaltando as propriedades farmacológicas, já foi descrito que todas as partes de *Moringa oleifera* são usadas para o tratamento de diversas doenças. Atividades hipotensora, anticancerígena, anti-inflamatória, analgésica, antibiótica, antitripanossomal, anti-ulcerativa, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante e hepatoprotetora, são algumas das propriedades que têm sido reportadas pelo uso popular e estudadas pela comunidade científica (FAIZI *et al.*, 1995; EZEAMUZLE *et al.*, 1996; MURAKAMI *et al.*, 1998; CHUANG *et al.*, 2007; CHUMARK *et al.*, 2008; FAKURAZI *et al.*, 2008; JAISWAL *et al.*, 2009).

Como já mencionado anteriormente, as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva já foram descritas para raízes, folhas e sementes (CÁCERES *et al.*, 1992; SULAIMAN *et al.*, 2008; SASHIDHARA *et al.*, 2009). Porém, apesar das fortes evidências científicas do poder anti-inflamatório e antinociceptivo de *M. oleifera*, estudos adicionais com ênfase em caracterização e isolamento de compostos bioativos são necessários para entender o mecanismo de ação e fornecer suporte científico para o uso desta tradicional planta.

Em nosso grupo de estudo foram isoladas proteínas ligantes à quitina de sementes de *M. oleifera*. Como essas proteínas têm a capacidade de se ligar a carboidrato (quitina), estão, portanto, inseridas no grupo das lectinas (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). Devido a alta reatividade e especificidade a epítomos de carboidratos, muitas lectinas foram descritas como anti-inflamatórias e antinociceptiva (PUSZTAI; BARDOCZ; EWEN, 2008).

Diante dos dados expostos, o presente trabalho teve como foco principal a purificação e caracterização de uma proteína ligante à quitina de *M. oleifera* com atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.

O procedimento de purificação foi o mesmo descrito por Gifoni (2009). O extrato protéico total das sementes rendeu uma quantidade significativa de proteínas ($216,44 \pm 4,72$ mg/gF). Segundo Gallão, Damasceno e Brito (2006), proteína é o composto encontrado em maior quantidade em sementes de *M. oleifera*, aproximadamente 40%, podendo ser comparada com sementes de grande importância na alimentação animal como a soja, que possui de 30-45% de proteína e feijão comum, com aproximadamente 22-36% (BURTON, 1997; MESQUITA *et al.*, 2007).

Após a obtenção de fração albumínica por diálise exaustiva, esta foi concentrada para ser aplicada em matriz de quitina, a fim de se obter proteínas ligantes à quitina. O primeiro pico retido (P_{NAG}) foi eluído por competição entre o monossacarídeo *N*-acetil-*D*-glucosamina e a quitina pelo sítio de ligação a carboidrato dessas proteínas. No caso do segundo pico (P_{AC}), as proteínas estavam tão fortemente ligadas à matriz, que foi necessária uma mudança de pH, pois assim, as proteínas mudam a sua conformação nativa e podem se desprender da quitina. P_{NAG} foi o pico escolhido para dar continuidade ao processo de purificação por se tratar de um material eluído estritamente por afinidade.

No segundo passo cromatográfico, P_{NAG} foi aplicado em uma matriz trocadora de cátions (Resource S) acoplada ao sistema de FPLC. Foram obtidos um pico não retido e quatro retidos utilizando-se concentrações crescentes de NaCl. Todos os picos receberam a denominação de *Mo*-CBP (*M. oleifera* – *chitin binding protein*), por se tratarem de materiais provenientes de P_{NAG} contendo proteínas ligantes a quitina. Como o presente trabalho teve como um dos objetivos verificar se o material purificado possuía atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, *Mo*-CBP₄ foi selecionada para dar continuidade aos estudos por se tratar do pico de maior rendimento protéico, uma vantagem quando se deseja realizar experimentação com animais.

Proteínas ligantes à quitina já foram isoladas de diversas espécies e geralmente possuem massas moleculares aparentes variando entre 3,1 e 20 kDa e pontos isoelétricos básicos, além de serem altamente resistentes a altas temperaturas (BORMANN *et al.*, 1999; BROEKAEST *et al.*, 1992). Muitas dessas proteínas ligantes à quitina são conhecidas pela atividade antifúngica que exercem, sendo classificadas como proteínas relacionadas à patogênese

do tipo 4 (PR-4) e subdivididas em duas classes: classe I, que têm um domínio NH₂-terminal ligante à quitina similar ao domínio presente em heveína, uma proteína encontrada em látex de *Hevea brasiliensis*; e classe II, que são aquelas que não possuem o domínio parecido com heveína (THEIS e STAHL, 2004). Em nosso grupo de estudo, foi avaliada a atividade antifúngica de *Mo*-CBP₄, sendo esta proteína capaz de inibir a germinação de esporos de *Fusarium solani* (um fungo bastante conhecido por ser fitopatogênico), um forte indício de esta proteína estar inserida no grupo das proteínas PR-4.

Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes foi realizada com o intuito de verificar a purificação do material, bem como determinar a massa molecular aparente de *Mo*-CBP₄. Como mostrado anteriormente na FIGURA 08, a proteína em condições não redutoras apresentou-se como duas bandas protéicas: uma de 27,5 kDa e outra de 16,5 kDa. Em condições redutoras, a proteína mostrou-se como única banda de massa molecular aparente de 9,8 kDa. Esse resultado sugere que a proteína parece estar nas formas trimérica e dimérica predominantes em condições não redutoras, e quando é adicionado o agente redutor, as pontes dissulfeto se desfazem resultando em monômeros com massas moleculares semelhantes (9 kDa). Vale salientar que a amostra utilizada na eletroforese não continha nenhuma molécula abaixo de 12 kDa, já que durante o processo de purificação de *Mo*-CBP₄ foram realizadas diversas diálises em membrana com porosidade de 12 kDa. Perfil eletroforético semelhante foi encontrado para uma hemaglutinina de sementes de *M. oleifera* denominada *MoL*. Esta proteína é uma hololectina que em PAGE-SDS apresentou massa molecular aparente de 7,1 kDa na presença de 2-mercaptoetanol. Contudo, na ausência do agente redutor mostrou-se como duas bandas com massas moleculares de 13,6 e 27,1 kDa, sendo esse evento explicado pela formação de agregados protéicos na molécula de 7,1 kDa (KATRE *et al.*, 2008).

Através de eletroforese bidimensional de *Mo*-CBP₄, foram encontrados dois spots de massas moleculares diferentes: um de 18,7 kDa e outro de 13,4 kDa. Provavelmente, assim como na eletroforese em condições desnaturantes a banda de 18,7 kDa seria a proteína na sua forma dimérica. Como no protocolo de eletroforese bidimensional o DTT está presente e sendo este um agente redutor, boa parte da banda de 18,7 kDa teve suas pontes dissulfeto

desfeitas, e toda a banda que representava o trímero foi produzindo banda de 13,4 kDa com maior intensidade .

O ponto isoelétrico de ambos os spots foi de 10,55, mostrando que a proteína deve apresentar em sua estrutura primária uma grande quantidade de resíduos de aminoácidos básicos, como arginina, lisina e histidina. O caráter básico de *Mo-CBP₄* corrobora com o fato de que esta proteína estaria positivamente carregada em pH 5,2, utilizado na cromatografia de troca iônica e por isso necessitou de uma alta concentração de NaCl (0,6 M) para ser eluída de uma matriz carregada negativamente (Resource S). Além disso, os resultados corroboram com aqueles encontrados para outras proteínas ligantes à quitina, descritas anteriormente (BROEKAEST *et al.*, 1992; BORMANN *et al.*, 1999).

Devido a *Mo-CBP₄* ser uma proteína de caráter básico, a eletroforese nativa em gel de poliacrilamida foi realizada em gel ácido (pH de 4,5) e tampão de corrida também ácido (com mesmo pH), a fim de se manter a carga da proteína e possibilitar a entrada no gel. Como pôde ser visualizado na FIGURA 10, o perfil eletroforético de *Mo-CBP₄* em condições nativas foi semelhante àquele encontrado em condições desnaturantes, apresentando-se também como duas bandas protéicas.

Em contraste às outras lectinas encontradas em sementes de *M. oleifera*, *Mo-CBP₄*, apesar de ser uma proteína que se liga ao polissacarídeo quitina, não foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelhos ou humanos (A, B e O), mesmo quando tratados com tripsina. A ausência de atividade hemaglutinante pode ser devido ao fato de a proteína possuir apenas um sítio de ligação a carboidrato. Segundo a classificação de lectinas proposta por Peumans e van Damme (1995), *Mo-CBP₄* estaria inserida no grupo das merolectinas, proteínas incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados, devido à presença de um único sítio de ligação a carboidrato.

Já foram isoladas diversas merolectinas ligantes à quitina como a heveína, uma proteína encontrada no látex de *Hevea brasiliensis*, que não foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho, pombo ou humanos (VAN PARIJS *et al.*, 1991). Em sabugueiro (*Sambucus nigra*) e *Withania somnifera* também foram isoladas proteínas “hevein-like”, incapazes de aglutinar eritrócitos (VAN DAMME, 1998; GHOSH, 2009).

Apesar de *Mo-CBP₄* se comportar como uma merolectina, não é descartada a hipótese de que a ausência de aglutinação seria devido ao não reconhecimento de carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos utilizados neste trabalho, necessitando de estudos mais detalhados que comprovem em qual grupo das lectinas a proteína em questão estaria inserida.

Assim como a maioria das lectinas, *Mo-CBP₄* é uma glicoproteína, pois foi corada pelo ácido periódico de Schiff. O teor glicídico da proteína foi estimado em 2,85%, porcentagem maior que aquela encontrada na hemaglutinina de sementes de *M. oleifera*, que foi de 1,5% (KATRE *et al.*, 2008). Apesar de não ter sido mencionado, foi realizada uma deglicosilação de *Mo-CBP₄*, utilizando uma sequência de enzimas diferentes que removem carboidratos N- e O-ligados a fim de esclarecer que tipo de carboidrato faz parte da proteína. O método consiste em retirar o carboidrato intrínseco a glicoproteína e realizar eletroforese para evidenciar a diferença nas massas entre a proteína com e sem carboidrato. Não foi visualizada diferença entre as massas de *Mo-CBP₄* com e sem carboidrato, talvez devido à pequena porcentagem glicídica que esta proteína possui. Outros métodos são necessários a fim de esclarecer o tipo de carboidrato que faz parte desta glicoproteína.

Sabe-se que a farinha de sementes de *M. oleifera* é usada tradicionalmente como coagulante natural no tratamento de água em países onde água potável é escassa (GASSENSCHIMIDT *et al.*, 1995). Os principais agentes coagulantes são proteínas catiônicas (pI entre 10-11), geralmente na forma homodimérica, com massas moleculares variando de 12-14 kDa (NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995). Inclusive *Mo-CBP₃*, uma proteína ligante à quitina obtida através das mesmas etapas cromatográficas de *Mo-CBP₄*, porém eluída da matriz de Resource S com concentração de NaCl menor, obteve características semelhantes a tais agentes bioativos de sementes de *M. oleifera* e foi capaz de coagular material em suspensão (GIFONI, 2009). Assim, devido à semelhança bioquímica de tais proteínas com *Mo-CBP₄*, foi testada a capacidade desta proteína de coagular material em suspensão. A metodologia utilizada foi a mesma descrita por Ghebremichael *et al.* (2005), que usa como parâmetro a turbidez da água. Esta turbidez corresponde à redução da transparência da água ocasionada pelo material em

suspensão, dificultando a passagem da luz pela solução. Normalmente a medida da turbidez é dada em NTU (*nephelometric turbidity units*) (TOMAZON *et al.*, 2005), porém, na metodologia descrita no presente trabalho foi utilizado a espectrofotometria, no comprimento de onda de 500 nm, para estimar a turbidez da água. Alta turbidez corresponde a uma absorvância em torno de 1.900 (250-300 NTU), enquanto que baixa turbidez tem absorvância de 0.500 (75-100 NTU).

Mo-CBP₄ foi capaz de coagular material em suspensão tanto para água de turbidez inicial alta como baixa, sendo que nesta última a atividade foi maior, chegando a um perfil semelhante ao do sulfato de alumínio e potássio. Acredita-se que o mecanismo de coagulação dessas proteínas de sementes de *M. oleifera* (incluindo *Mo*-CBP₄) seja regido por forças do tipo Coulomb, ou seja, atração e repulsão de cargas. Como estas proteínas são macromoléculas catiônicas, as cargas positivas sobre suas superfícies se ligam eletrostaticamente com partículas negativas de argila e bactérias. A redução da repulsão eletrostática leva a aglomeração das partículas. Geralmente uma pequena parte carregada positivamente das macromoléculas liga-se a uma partícula negativa, assim, muitas outras cargas em suas superfícies ficam livres para se ligarem a outras partículas, formando assim os flocos, que por gravidade decantam, deixando a água livre de resíduos (GASSENSCHIMDT *et al.*, 1995).

Coagulantes naturais podem ser encontrados em muitas espécies de plantas como em sementes de *Cassia angustifolia*, castanha e, inclusive, no feijão comum. Entretanto, os coagulantes mais conhecidos e estudados são aqueles provenientes de sementes de *M. oleifera* (SANGHI; BHATTACHARYA; SINGH, 2002; SCIBAN *et al.*, 2009; ANTOV e SCIBANA, 2010). Os floculantes naturais, assim como *Mo*-CBP₄, têm vantagem sobre os sais de alumínio, por serem biodegradáveis e produzirem menor volume de resíduos sedimentados, causando, portanto, menos dano ao meio ambiente (NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995; KATAYON *et al.*, 2006). Além disso, sais de alumínio (coagulante inorgânico vastamente utilizado) são extremamente neurotóxicos e possuem propriedades carcinogênicas (MALLEVIALLE; BRICHET; FIESSINGER, 1984). De acordo com a resolução nº 20 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 1986), que define

parâmetros e indicadores específicos para avaliar a qualidade de águas doces, salobras e salinas, estabelece-se como limite máximo de alumínio uma concentração de 0,1 mg/L na água tratada destinada ao abastecimento doméstico. Na Europa o máximo permitido dos sais de alumínio chega a 0,1 µg/L (*Commission Directive 98/83/EC*, 1998). Em adição, estudo de toxicidade aguda em ratos demonstrou que extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* é considerado apenas moderadamente tóxico (LD₅₀ de 446,5 mg/kg de peso corpóreo), quando comparado aos padrões toxicológicos humanos (HODGE e STERNER, 1944 *apud* FERREIRA *et al.*, 2009).

Sabendo-se das propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória de *M. oleifera*, o próximo passo do trabalho foi buscar um princípio ativo responsável por tais atividades nas sementes. A atividade antinociceptiva foi testada utilizando o método clássico de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Apesar de este modelo ser pouco específico, possui boa sensibilidade, sendo uma ferramenta de triagem para descoberta de novos agentes analgésicos. Além disso, esse teste pode ser considerado como um teste pré-clínico de importância para avaliação do efeito antinociceptivo porque permite uma correlação adequada entre o valor da dose eficaz em animais e as doses analgésicas em humanos (COLLIER *et al.*, 1968; IKEDA *et al.*, 2001; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

É conhecido que muitas lectinas possuem atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, portanto, primeiramente foi testada a fração rica em proteínas ligantes à quitina, eluídas exclusivamente por competição (P_{NAG}). Como mostrado anteriormente, P_{NAG} foi capaz de inibir em 66,1% as contorções causadas pela administração intraperitoneal de ácido acético. Ao realizar o mesmo teste com Mo-CBP₄ já purificada, na mesma dose utilizada para P_{NAG}, a inibição aumentou para 98,9%, indicando uma concentração da atividade antinociceptiva ao longo da purificação. Quando foram utilizadas doses de 1, 3,5 e 10 mg/kg de peso corpóreo, a atividade antinociceptiva de Mo-CBP₄ também aumentou, mostrando que o efeito é dose-dependente, chegando a um nível de inibição de quase 100% já na dose de 10 mg/kg. O efeito antinociceptivo da proteína em questão foi superior ao da indometacina, um analgésico utilizado como controle positivo neste tipo de teste, mostrando que esta proteína possui potente atividade analgésica.

É sabido que o ácido acético atua indiretamente através da liberação de mediadores endógenos que estimulam os neurônios nociceptivos. Em camundongos, após a injeção intraperitoneal de ácido acético, há um aumento nos níveis de PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, como também produtos da lipooxigenase no fluido peritoneal. A liberação de tais mediadores é precedida da liberação de $TNF-\alpha$, interleucina- 1β e interleucina 8 provenientes de células residentes (macrófagos e mastócitos) (RIBEIRO *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001). Além disso, a injeção de ácido acético também pode ativar diretamente canais de cátions não-seletivos localizados na via aferente primária (JULIUS e BASBAUM, 2001). O resultado é uma inflamação aguda no peritônio com aumento da permeabilidade vascular, irritação peritoneal e dor aguda, que faz o animal responder através de contorções abdominais, redução e incoordenação da atividade motora (BRAGGIO *et al.*, 2002; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Portanto, $Mo-CBP_4$ pode estar inibindo a biossíntese ou a ação de mediadores inflamatórios, principalmente PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, agindo de forma periférica, ou pode estar agindo diretamente no sistema nervoso central.

A atividade de $Mo-CBP_4$ segue a característica de muitas lectinas, como aquela encontrada em sementes de *Canavalia grandiflora*, que foi capaz de inibir a hipernocicepção mecânica causada por carragenina (efeito hipernociceptivo inflamatório), na dose de 10 mg/kg, via endovenosa (NUNES *et al.*, 2009). Lectinas de algas marinhas, como a aglutinina de *Hypnea cercornis* (HCA) e a de *Caulerpa cupressoides* (LCc), na dose de 10 mg/kg, também foram capazes de inibir em 72 e 86% respectivamente, as contorções induzidas por ácido acético (BITENCOUR, 2007; VANDERLEI, 2008).

Nas raízes de *M. oleifera*, um dipeptídeo (acetato de aurantiamida) e um derivado de uréia apresentaram significativa inibição de $TNF-\alpha$, interleucina 2 e na dor por estimulação térmica, mostrando que estes compostos são os responsáveis pelas atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de raízes, que são tradicionalmente usadas para dores de artrite reumatóide (SASHIDARA *et al.*, 2009). O extrato aquoso das folhas de *M. oleifera* exibiu atividade antinociceptiva dose-dependente no teste de contorção induzida por ácido acético e a infusão das sementes mostrou atividade anti-inflamatória (CÁCERES *et al.*, 1992; SULAIMAN *et al.*, 2008). Porém, não há relatos na

literatura de uma proteína de sementes de *M. oleifera* com potente atividade antinociceptiva, mostrando a originalidade do presente trabalho.

Sabendo-se que, em sua maioria, os fármacos são administrados pela via oral e deglutidos, foi investigada a atividade antinociceptiva de *Mo-CBP₄* por via oral, visando a utilização desta proteína como um futuro fitoterápico. Para isso, foi testada a dose de 10 mg/kg, que corresponde a dose de maior inibição das contorções quando a proteína foi administrada intraperitonealmente. A administração da proteína 30 minutos antes da injeção de ácido acético foi capaz de inibir em 18% as contorções. Quando o tempo entre a administração de *Mo-CBP₄* e de ácido acético foi maior (60 minutos), a inibição das contorções foi ainda maior, chegando a 52,9%, quando comparado ao grupo controle, quase três vezes maior que no tempo de 30 minutos. Na verdade, é sabido que a absorção é mais lenta quando um fármaco é administrado via oral. Geralmente para que 75% de uma substância seja absorvida quando administrada oralmente, é necessário um tempo de 1-3 horas (HANG *et al.*, 2007). No presente estudo, efeito inibitório de *Mo-CBP₄* foi maior quando o tempo também foi maior. Em contrapartida, quando uma substância é administrada intraperitonealmente, esta é mais rapidamente absorvida devido a maior área de contato e irrigação sanguínea naquela região. Dessa forma, na mesma dose (10 mg/kg) e mesmo tempo (30 minutos), a atividade antinociceptiva da proteína foi bem maior pela via intraperitoneal do que pela via oral.

É de conhecimento que uma substância quando passa pelo trato gastrointestinal está sujeita a diversos fatores que provocariam sua inativação, como a digestão mecânica, a digestão enzimática e os extremos de pH. O fato de *Mo-CBP₄* apresentar efeito antinociceptivo pela via oral sugere que esta proteína seja, pelo menos, parcialmente resistente a tais fatores. Assim, foi analisada a digestibilidade *in vitro* de *Mo-CBP₄*, utilizando proteases que são encontradas no sistema digestório de animais monogástricos, como a pepsina, tripsina e quimotripsina. Inicialmente, a digestão foi realizada com as enzimas separadamente e depois foi estimulada a digestão como ocorre em seu curso ao longo do trato gastrointestinal, isto é, de forma sequencial.

Como mostrado na FIGURA 14, o perfil eletroforético de *Mo-CBP₄* após incubação com pepsina em pH ácido, em diferentes tempos, indica que, em comparação ao controle (BSA), a proteína não foi completamente digerida pela pepsina. Assim, moléculas de *Mo-CBP₄* podem ter atravessado o estômago do animal sem ter sido hidrolisadas, chegando de forma íntegra ao intestino delgado. Assim sendo, foi avaliada a digestibilidade *in vitro* de *Mo-CBP₄* pela tripsina e quimotripsina separadamente. *Mo-CBP₄*, em relação ao controle, não foi completamente digerida por ambas as enzimas.

Na simulação da digestão como ocorre em seu curso ao longo do trato gastrointestinal, enquanto BSA foi completamente digerida já com a ação da pepsina, *Mo-CBP₄* se mostrou resistente à proteólise total (depois de pepsina, tripsina e quimotripsina). Dessa forma, pode ser colocado que a proteína não é completamente digerida pelas enzimas do trato gastrointestinal de animais monogástricos, sendo absorvida em uma forma ainda capaz de exercer sua ação antinociceptiva como mostrada anteriormente. A resistência de *Mo-CBP₄* às enzimas digestivas corrobora com resultados encontrados para outras proteínas ligantes à quitina que são altamente resistentes a extremos de pH e proteases, tornando-se uma característica comum entre estas proteínas (BROEKAEST *et al.*, 1992; BORMANN *et al.*, 1999).

Geralmente, no indivíduo adulto, as proteínas são completamente digeridas antes de serem absorvidas. Exceções acontecem para alguns alérgenos, por exemplo (MATTHEWS, 1971). Porém, é sabido que proteínas de plantas são geralmente mais resistentes a proteólise que a maioria das proteínas animais (FRIEDMAN, 1996; SGARBIERI, 1996; EL-ADAWY, 2002). A aparente digestibilidade de proteínas *in vivo* de sementes cruas de leguminosas e de oleaginosas varia de 15,6% a aproximadamente 80%, dependendo de sua origem (GRANT *et al.*, 1995; CARBONARO *et al.*, 2000; PREET e PUNIA, 2000; CUADRADO *et al.*, 2002). Em contraste, proteínas animais, como a BSA, ou a caseína, são 85-94% digeridas *in vivo* (OLIVEIRA *et al.*, 1999; VASCONCELOS *et al.*, 2001). Em particular, assim como *Mo-CBP₄*, muitas lectinas de plantas mostraram ser resistentes a degradação por proteases *in vitro* e *in vivo*, podendo ser de fato uma característica comum entre as lectinas (CARBONARO *et al.*, 1997; PUSZTAI, 1991; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). É possível que no intestino, tais proteínas sejam

protegidas da proteólise devido à ligação com componentes do epitélio e lúmen intestinais. Lectinas, quando ligadas às células epiteliais do intestino, podem ser internalizadas por endocitose e depois liberadas para o espaço intercelular por exocitose. Assim, formas íntegras e reativas das lectinas podem ser distribuídas na circulação e tecidos internos (VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). Lectinas com especificidade a *N*-acetil-*D*-glucosamina, como WGA (aglutinina do gérmen de trigo), UDA (aglutinina de *Urtica dioica*) e DAS (aglutinina de *Datura stramonium*), quando oferecidas a ratos (7 g/kg de dieta), ligam-se às células epiteliais do intestino delgado e são endocitadas (PUSZTAI *et al.*, 1993). *Mo*-CBP₄, que também é uma lectina com açúcar ligante específico *N*-acetil-*D*-glucosamina, deve ser absorvida pelo mesmo mecanismo que o das aglutininas citadas acima.

Como já descrito anteriormente, a atividade anti-inflamatória já foi reportada para diversas partes de *M. oleifera*, inclusive em suas sementes, porém não foi isolada nenhuma substância responsável por tal atividade. Assim, foi testada a atividade anti-inflamatória de *Mo*-CBP₄, já que esta proteína já havia mostrado atividade antinociceptiva que, por sua vez, poderia estar diretamente relacionada com inibição da produção ou ação de mediadores inflamatórios. Os modelos utilizados foram os de efeito sobre a permeabilidade vascular e migração leucocitária induzidas por ácido acético.

O modelo de permeabilidade vascular consistiu na administração intravenosa de corante azul de Evans, que se liga as proteínas do plasma (albumina), formando um complexo corante-albumina. Quando o ácido acético é injetado intraperitonealmente, ocorre dilatação dos capilares pela contração e separação das células endoteliais, expondo a membrana basal que é livremente permeável à proteínas do plasma (OKOLI *et al.*, 2007). Assim, o complexo corante-albumina é extravasado para a cavidade peritoneal, podendo o azul de Evans ser mensurado através de espectrofotometria. Este ensaio foi realizado simultaneamente ao de contorções abdominais, sendo o azul de Evans injetado 30 minutos antes do tratamento com *Mo*-CBP₄ e ao final da contagem das contorções os animais foram sacrificados para obtenção do lavado peritoneal para quantificação do extravasamento do corante por espectrofotometria.

Mo-CBP₄ preveniu o aumento da permeabilidade vascular de maneira dose-dependente, chegando a uma inibição de 89,1% para a maior dose. A migração celular também foi inibida em até 60,9%, quando comparada ao grupo controle. Portanto, *Mo*-CBP₄ mostrou-se como um potente agente anti-inflamatório. Estudos posteriores devem ser realizados a fim de esclarecer o mecanismo de ação anti-inflamatório e antinociceptivo desta proteína.

Mo-CBP₄ pode ser comparada a muitas lectinas que também possuem atividades antinociceptiva e anti-inflamatória. Em sementes de *Araucaria angustifolia*, uma lectina ligante à quitina (*AaL*) exerce efeito anti-inflamatório inibindo a liberação de mediadores de mastócitos residentes (MOTA *et al.*, 2006). Outra lectina encontrada em sementes de *Canavalia grandiflora* (*ConGF*) apresentou efeito analgésico e anti-inflamatório, inibindo a migração neutrofílica e hipernocicepção inflamatória mecânica, mediadas via IL-1 β e TNF- α , redução do rolamento e adesão endotelial de leucócitos (NUNES *et al.*, 2009).

Para algumas dessas lectinas, o sítio de ligação ao carboidrato é uma região indispensável para exercerem suas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, como o caso da lectina de *Araucaria angustifolia*, que tem especificidade também pelo açúcar *N*-acetil-*D*-glucosamina (MOTA *et al.*, 2006). Portanto, para saber se há envolvimento do sítio de ligação a carboidrato de *Mo*-CBP₄ em suas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, a proteína foi incubada com o açúcar específico *N*-acetil-*D*-glucosamina antes de ser injetada em camundongos a fim de avaliar se havia prevenção das contorções e migração leucocitária induzidas por ácido acético. Os resultados obtidos mostraram que a atividade antinociceptiva independe do sítio de ligação a carboidrato da lectina. Porém, quando foi testado o efeito do açúcar na atividade anti-inflamatória, houve uma reversão parcial da migração leucocitária. Como já foi exposto, a migração leucocitária apresenta-se em cinco eventos: marginação, rolamento, adesão, diapedese e quimiotaxia; esses eventos são dependentes de moléculas de adesão presentes tanto na membrana dos leucócitos, quanto na membrana das células que revestem o endotélio vascular. Dentre as moléculas de adesão, destacam-se as selectinas, que são proteínas capazes de se ligar a carboidrato, ou seja, lectinas (ROBINS *et al.*, 2005). Portanto a migração depende de uma interação lectina-

carboidrato. Algumas lectinas exógenas podem se ligar aos carboidratos atrapalhando a adesão das selectinas e, por conseguinte, a rolagem e posterior diapedese dos leucócitos no processo inflamatório (ALENCAR *et al.*, 1999). Sendo *Mo*-CBP₄ uma lectina, a inibição da migração leucocitária pode estar ocorrendo via competição entre esta proteína e as selectinas presentes nos leucócitos ou células endoteliais pelos carboidratos. Assim, quando o sítio de interação a carboidrato de *Mo*-CBP₄ é bloqueado, incubando a proteína com o açúcar ligante específico (*N*-acetil-D-glucosamina), a atividade anti-inflamatória é revertida. Os resultados apresentados corroboram com estudos realizados por Alencar *et al.* (1999), no qual consistiram em investigar o envolvimento de três açúcares diferentes (incluindo o *N*-acetil-D-glucosamina) na migração leucocitária induzida por carragenina, utilizando três lectinas anti-inflamatórias. Nesse estudo, foi mostrado que glicoconjugados de *N*-acetil-D-glucosamina são essenciais para o recrutamento de neutrófilos. Assim, pode ser inferido que *Mo*-CBP₄ torna-se uma ferramenta específica na prevenção da migração leucocitária e, por conseguinte, da atividade anti-inflamatória.

É sabido que muitas proteínas são utilizadas hoje em dia como agentes terapêuticos em condições específicas, sendo chamadas de biofármacos. Dentre as vantagens da utilização dessas proteínas, destaca-se a alta especificidade a um conjunto de funções complexas que nenhum composto químico pode imitar. Devido à alta especificidade das proteínas, elas pouco interferem com processos biológicos normais acarretando em menos efeitos adversos (LEADER; BACA; GOLAN, 2008; STROHL e KNIGHT, 2009). Assim, os resultados obtidos sugerem que *Mo*-CBP₄ possa ser utilizado como um futuro fármaco devido às suas potentes atividades antinociceptiva e anti-inflamatória. Estudos ainda devem ser realizados a fim de esclarecer o mecanismo de ação e caracterizar melhor a proteína, além de sua avaliação toxicológica para um possível uso de *Mo*-CBP₄ como um fármaco.

8. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi purificada uma proteína ligante à quitina de sementes de *Moringa oleifera* denominada de *Mo-CBP₄*, que se apresentou como uma glicoproteína com massa molecular aparente de 9,8 kDa, em condições redutoras, e ponto isoelétrico de 10,55. Nas condições de ensaio, *Mo-CBP₄* se comportou como uma merolectina, bastante resistente à proteólise, com apreciável capacidade de coagular material em suspensão na água e potentes atividades antinociceptiva (via i.p. ou oral) e anti-inflamatória (i.p.). A propriedade anti-inflamatória parece envolver seu sítio de interação ao açúcar *N*-acetil-D-glucosamina, mas a antinociceptiva não.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.; HAVT, A.; BENEVIDES, R.G.; DE MOURA, T.R.; DE SOUSA, R.B.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S.; *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, p. 275-282, 2007.

ALENCAR, N.M.N.; TEIXEIRA, E.H.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S.; FLORES, C.A.; RIBEIRO, R.A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, v. 8, p. 107-113, 1999.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, V.B.M.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 35, p. 1674-1681, 2003.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.; CRIDDLE, D.N.; SOUZA, E.P.; SOARES, P.M.; HAVT, A.; ARAGAO, K.S.; BEZERRA, D.P.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. **Protein and Peptide Letters**, v. 11, p. 195-200, 2004.

ALENCAR, V.B.M.; ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; MOTA, M.L.; BRITO, G.A.C.; ARAGÃO, K.S.; BITENCOURT, F.S.; PINTO, V.P.T.; DEBRAY, H.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, p. 1805-1814, 2005.

ALENCAR, V.B.M.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, N.M.N.; MEIRELES, A.V.P.; MOTA, M.R.L.; ARAGÃO, K.S.; CAJAZEIRAS, J.B.; NAGANO, C.S.; BRITO, G.A.C.; SILVA, L.I.M.M.; PINTO, V.P.T.; SAMPAIO, A.H.; DEBRAY, H.; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces *in vivo* and *in vitro* neutrophil migration. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 375-381, 2005b.

ALENCAR, V.B.M.; BRITO, G.A.C.; ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; PINTO, V.P.T.; TEIXEIRA, E.H.; SOUZA, E.P.; DEBRAY, H.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. *Helianthus tuberosus* agglutinin directly induces neutrophil migration, which can be modulated/inhibited by resident mast cells. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 83, p. 659-666, 2005c.

AMAYA, D.R.; KERR, W.E.; GODOI, H.T.; OLIVEIRA, A.L.; SILVA, F.R. Moringa: hortaliça arbórea rica em beta-caroteno. **Horticultura Brasileira**, v.10(2), p.126, 1992.

ANDRADE, C.A.; CORREIA, M.T.; COELHO, L.C.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 8, p. 435-445, 2004.

ANTOV, M.G.; ŠĆIBANA, M.B.; , N.J. Proteins from common bean (*Phaseolus vulgaris*) seed as a natural coagulant for potential application in water turbidity removal. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2167-2172, 2010.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A.H. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 17-25, 2007.

ASENSIO, J. L.; CANADA, F. J.; SIEBERT, H. C.; LAYNEZ, J.; POVEDA, A.; NIETO, P. M.; SOEDJANAAMADJA, U. M.; GABIUS, H. J.; JIMENEZ-BARBERO, J. Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. **Chemical Biology**, v. 7, p. 529-543, 2000.

ASSREUY, A.M.S.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G.J.; SOUZA, M.L.P.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 201-210, 1997.

AVIDES, M.C.; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A. Apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (futalin) of *Artocarpus incisa* seeds. **Phytomedicine**, In Press, 2010.

BACH, M.K.; BRASHLER, J.R. Inhibition of IgE and compound 48/80-induced histamine release by lectins. **Immunology**, v. 29(2), p. 371–386, 1975.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.M.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. **Immunological Investigations**, v. 21, p. 297-303, 1992.

BENTO, C.A.M.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Inflammation Research**, v. 38, p. 48-54, 1993.

BHATTI, H.N.; MUMTAZ, B.; HANIF, M.A.; NADEEM, R. Removal of Zn (II) ions from aqueous solution using *Moringa oleifera* Lam. (horseradish tree) biomass. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 547-553, 2007.

BHUPTAWAT, H.; FOLKARD, G.H.; CHAUDHARI, S. Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant. **Journal of hazardous Materials**, v. 142, p. 477-482, 2007.

BITENCOURT, F.S. Estudo da atividade antiinflamatória e antinociceptiva da lectina isolada da alga marinha vermelha *Hypnea cervicornis* (j. Agardh). **Tese (Doutorado em Farmacologia)** – Universidade Federal do Ceará, 2007.

BORMANN, C.; BAIER, D.; HERR, I.; RAPS, C.; BERGER, J.; JUNG, G.; AND SCHWARZ, H. Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein from *Streptomyces tendae* Tu901 that interferes with growth polarity. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 7421–7429, 1999.

BOYD, W.C., REGUERA, R.M. Studies on haemagglutinins present in seeds of some representatives of the family Leguminosae. **Journal of Immunology**, v. 62, p. 333–339, 1949.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.722, p. 248-254, 1976.

BRAGGIO, M. M.; LIMA, M. E. L.; VEASEY, E. A.; HARAGUCHI. Atividades farmacológicas das folhas de *Sesbania virgata* (cav.) pers. **Arquivo do Instituto de Biologia**. v. 69, n.4, p.49-53, 2002.

BROEKAERT, W.F.; ALLEN, A.K.; PEUMANS, W.J. Separation and partial characterization of isolectins with different subunit compositions from *Datura stramonium* seeds. **FEBS Letters**, v. 220, p. 116–120, 1987.

BROEKAERT, W.F.; MARIËN, W.; TERRAS, F.R.G.; DE BOLLE M, F.C.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; DILLEN, L.; CLAEYS, M.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B.P.A. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. **Biochemistry**, v. 31 (17), p. 4308-4314, 1992.

BURTON, J.W. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Field Crops Research**, n. 53, p. 171-186, 1997.

CARBONARO, M.; CAPPELLONI, M.; NICOLI, S.; LUCARINI, M.; CARNOVALE, E. Solubility-digestibility relationship of legume proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3387–3394, 1997.

CARBONARO, M.; GRANT, G.; CAPPELLONI, M.; PUSZTAI, A. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: antinutritional compounds or storage proteins? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 742–749, 2000.

CÁCERES A., SARAIVA A., RIZZIO S., ZABALA L., DE LEON E., NAVY F. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 2: screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36(3), p. 233-237, 1992.

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 20, p. 1515–1539, 2002.

CARVALHO, W.A. Mecanismo de ação das drogas antiinflamatórias não-esteróides. I- Ações farmacológicas das prostaglandinas e leucotrienos. **Farmacologia Médica (Br.)**, v. 100, p. 37-44, 1990.

CAVADA, B.S.; IGLESIAS, M.M.; TRONCOSO, M.F.; TEIXEIRA, E.H.; TURYN, D.; DOMINICI, F.P. Glucose-mannose-binding lectins isolated from Brazilian beans stimulate the autophosphorylation of the insulin receptor in vitro. **Hormone and Metabolic Research**, v. 35, p.125-127, 2003.

CESARE,P.; MCNAUGHTON, P.A. Peripheral pain mechanisms. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 7, p. 493-499, 1997.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAÍ, H.; ROOS, K.L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 21, p. 926-931, 2002.

CHUANG, P.H.; LEE, C.W.; CHOU, J.Y.; MURUGAN, M.; SHIEH, B.J.; CHEN, H.M. Antifungal activity of crude extracts and essential oils of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 232-236, 2007.

CHUMARK, P.; KHUNAWAT, P.; SANVARINDA, Y.; PHORNCHIRASILP, S.; MORALES, N.P. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 439-446, 2008.

CHUNG, Y.H.; KIM, J.A.; SONG, B.C.; SONG, I.H.; KOH, M.S.; LEE, H.S.; YU, E.; LEE, Y.S.; SU, D.J. Centrilobular hepatic necrosis; isocitrate dehydrogenase as a marker of centrilobular model of rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, p. 328-332, 2001.

CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.P.; KOMURA, D.L.; MARCON, R.; FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; SANTOS, A.R.S.; TORRI, G.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chemistry**, v. 111, p. 531–537, 2008.

COELHO, M.B.; DE SOUZA, I.A.; FREIRE, M.G.M.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; MACEDO, M.L.R. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon**, v. 48, p. 529-535, 2006.

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v.32, p. 295-310, 1968.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO Nº 20, de 18 de junho de 1986. Disponível em: <<http://www.fundema.sc.gov.br/upload/arquivos/res2086.htm>> Acesso em 13 Fev, 2010.

CUADRADO, C.; GRANT, G.; RUBIO, L.; MUZQUIZ, M.; BARDOCZ, S.; PUSZTAI, A. Nutritional utilization by the rat of diets based on lentil (*Lens culinaris*) seed meal or its fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4371–4376, 2002.

CYSNE, J.R.B. Propagação in vitro de *Moringa oleifera* L. **Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)** - Universidade Federal do Ceará, 2006.

DAHOT, M.U. Vitamin contents of the flowers and seeds of *Moringa oleifera* L. **Journal of Biochemistry**, v.21(1-2), p.21-24, 1998.

DASTUR, J.F. Medicinal plants of Indian and Pakistan. D. B. Taraporevala and Co. Delphi, p. 113-114, 1977.

DUBOIS, M. GILLES, K. A., HAMILTON, J. K. , REBERS, P. A. , SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analitical Chemistry**, v. 28, n.3, p. 350-356, 1956.

DUKE, J.A. The quest of tolerant germplasm. In: YOUNG, G. **Crop tolerance to subtropical land conditions**. Madison. American Society Agronomical Special Symposium, v.32, p.1-16, 1978.

EL-ADAWY, T.A.. Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, p. 83–97, 2002.

EZEAMUZLE, I.C.; AMBEDEDEROMO, A.W.; SHODE, F.O.; EKWEBELEM, S.C. Anti- inflammatory effects of *Moringa oleifera* root extract, **International Journal of Pharmacognosy**, v. 34, p. 207-212, 1996.

FAHEY, J.W. *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. **Trees for Life Journal**, v. 1(5), 2005.

FAIZI, S.; SIDDIQUI, B.S.; SALEEM, R.; SIDDIQUI, S.; AFTAB, K.; GILANI, A.H. Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 957- 963, 1995.

FAKURAZI, S.; ITHININ, H.; GAUDAR, U.N.L. *Moringa oleifera* Lam, prevents acetaminophen induced liver injury through restoration of glutathione level. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2611-2615, 2008.

FALTAS, B.S.M. Papyrus surgery *Student B.M.J.*, v.12, p.338-339, 2004.
FERREIRA, P.M.P; CARVALHO, A.F.U.; FARIAS, D.F.; CARIOLANO, N.G.; MELO, V.M.M.; MACHADO, J.G.; MARTINS, A.M.C.; MACHADO-NETO, J.G. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81(2), p. 207-216, 2009.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v.21, p. 431-437, 2008.

FERREIRA, S.H. Are macrophages the body's alarmme cells? **Agents and actions**, v. 10, p. 229, 1980.

FIGUEIREDO J.G.; BITENCOURT F.S.; MOTA M.R.L.; SILVESTRE P.P.; AGUIAR C.N.; BENEVIDES R.G.; NASCIMENTO K.S.; (...); ALENCAR N.M.N. Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *Dioclea rostrata* lectin: Involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon**, v. 54(6), p. 736-744, 2009.

FOIDL, N.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER K. The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. In: **The Miracle Tree/ The Multiple Attributes of Moringa**, Ed. Lowell J Fuglie, CTA. USA, 2001.

FORTES, Z.B.; HYSLOP, S.; DENUCCI, G. Endothelial-derived vascular relaxing factors: role of nitric oxide. In: **Immunopharmacology of the Microcirculation**, Ed. BRAIN, S.D. & PAGE, C., p. 16-42, New York, 1994.

FRANCIS, J.A.; JAYAPRAKASAM, B.; OLSON, L.K.; NAIR, M.G. Insulin secretagogues from *Moringa oleifera* with cyclooxygenase enzyme and lipid peroxidation inhibitory activities. **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, p. 317-326, 2004.

FREIRE, M.G.M.; DESOUZA, I.A.; SILVA, A.C.M.; MACEDO, M.L.R.; LIMA, M.S.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**, v. 42, p. 275-280, 2003.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 6–20, 1996.

FUGLIE, L. The Miracle Tree. *Moringa oleifera*: natural nutrition for the tropics. CWS/Dakar, p. 68, 1999.

GALLÃO, M.I.; DAMASCENO, L.F.; BRITO, E.S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 37(1), p.106-109, 2006.

GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K.D.; TAUSCHER, B.; NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1243, p. 477-481, 1995.

GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K.D.; TAUSCHER, B.; NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1243, p. 477-481, 1995.

GHASI, S.; NWOBOBO, E.; OFILI, J.O. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 21-25, 2000.

GHEBREMICHAEL K.A., GUNARATNA K.R., HENRIKSSON H., BRUMER H., DALHAMMAR G. Simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water Resources Research**, v. 39(11), p. 2338–2344, 2005.

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

GIFONI, J.M., Propriedades bioquímicas e funcionais de uma proteína ligante a quitina purificada de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** – Universidade Federal do Ceará, 2009.

GIFONI, J.M., Proteínas ligantes à quitina de sementes de *Moringa oleifera* Lamark e seu papel na defesa da planta. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** – Universidade Federal do Ceará, 2005.

GILANI, A.H.; AFTAB, K.; SURIA, A.; SIDDIQUI, S.; SALEM, R.; SIDDIQUI, B.S. Pharmacological studies on hypotensive and spasmolytic activities of purê

compounds from *Moringa oleifera*. **Phytotherapy Research**, v. 8(2), p. 87-91, 1994.

GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M.; OZAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p.60, 1980.

GOMES, J.C.; FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans: comparison with concanavalin A. **Inflammation Research**, v. 41, p. 132-135, 1994.

GONZALEZ-AMARO, R.; SANCHEZ-MADRID, F. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. **Critical Reviews in Immunology**, v. 19, p. 389–429, 1999.

GÖRG, A., OBERMAIER, O., BOGUTH, G., HARDER, A., SCHEIBE, B., WILDGRUBER, R., WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1037-1053, 2000.

GRANT, G.; MORE, L.J.; MCKENZIE, N.H.; DORWARD, P.M.; BUCHAN, W.C.; TELEK, L.; PUSZTAI, A. Nutritional and haemagglutination properties of several tropical seeds. **Journal of Agricultural Science**, v. 124, p. 437–445, 1995.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; CHAKRABARTI, S. CNS activities of methanolic extract of *Moringa oleifera* root in mice. **Fitoterapia**, v. 70(3), p. 244-50, 1999.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HAMZA, A.A. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 345-355, 2010.

HANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K.; *Farmacologia*, 6^a ed., Elsevier: São Paulo, 2007.

HODGE, H.C.; STERNER, J.H. Tabulation of toxicity classes. **American Industrial Hygiene Association**, v. 10, p. 94–97, 1944.

HUKKERI, V.I.; NAGATHAN, C.V.; KARADI, R.V.; PATIL, B.S. Antipyretic and wound healing activities of *Moringa oleifera* lam. in rats. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, p. 124-126, 2006.

HUTTENLOCHER, A.; SANDBORG, R. R.; HORWITZ, A. F. Adhesion in cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, p. 697-706, 1995.

IKEDA, Y.; UENO A.; NARABA, H.; OH-ISHI; Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v.69, p. 2911-2919, 2001.

JAHEY, J.W. *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. **Trees for Life Journal**, 1:5, 2005.

JAHN S.A.A.; MUSNAD H.A.; BURGSTALLER H. The tree that purifies water. Cultivating multipurpose Moringaceae in the Sudan. **Unasyva**, v. 38(152), p. 23-28, 1986

JAISWAL, D.; RAI, P.K.; KUMAR, A.; MEHTA, S.; WATAL, G. Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 392-396, 2009.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413 (6852), p. 203-10, 2001.

KATAYON, S.; MEGAT MOHD NOOR, M.J.; ASMA, M.; ABDUL GHANDI, L.A.; THAMER, A.M.; AZNI, I.; AHMAD, J.; KHOR, B.C.; SULEYMAN, A.M. Effects of storage conditions of *Moringa oleifera* seeds on its performance in coagulation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1455-1460, 2006.

KATRE, U.V.; SURESH, C.G.; KHAN, M.I.; GAIKWAD, S.M. Structure-activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 203-207, 2008.

KLEHA, J. F.; DEVESLY, P.; JOHNS, A. The effects of lectins on the release of EDRF from rabbit aorta. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, p. 287-288, 1991.

KOSTER, R., ANDERSON, M., DE BEER, J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412-417, 1959.

KUMARI, P.; SHARMA, P.; SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, M.M. Arsenic removal from the aqueous system using plant biomass: A bioremedial approach. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 521-526, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.

LAMPUGNAMI, M.G.; DEJANA, E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, p. 674, 1997.

LANSEN, G.L.; HENSON, P.M. Mediators of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, p. 335-359, 1993.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v.53, p.597-652, 2001.

LEADER, B.; BACA, Q.J.; GOLAN, D.E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 21-39, 2008.

LIMA, R.F.; CRIDDLE, D.N.; SOUZA, E.P.; SAMPAIO, A.H.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; ASSREUY, A.M. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 1415-1421, 2004.

LIS, H.; SHARON, N. Soybean (*Glycine max*) agglutinin. **Methods in Enzymology**, v. 28, p. 360-368, 1972.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v.98, p.637-674, 1998.

LIU, B.; Bian, H.J.; BAO, J.K. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters**, v. 287, p. 1-12, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 347, 2002.

LUSCINSKAS, F.W.; Ma, S.; NUSRAT, A.; PARKOS, C.A; SHAW, S.K. Leukocyte transendothelial migration: A junctional affair. **Seminars in Immunology**, v. 14(2), p. 105-113, 2002.

MACIEL, E.V.; ARAUJO-FILHO, V.S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y.M.; COELHO, L.C.; CORREIA, M.T. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, p. 57-60, 2004.

MAHAJAN, S.G., MALI, R.G; MEHTA, A.A. Protective Effect of Ethanolic Extract of Seeds of *Moringa oleifera* Lam. Against Inflammation Associated with Development of Arthritis in Rats. **Journal of Immunotoxicology**, v. 4, p. 39-47, 2007a.

MAHAJAN, S.G., MALI, R.G; MEHTA, A.A. Inhibitory Action of Ethanolic Extract of Seeds of *Moringa oleifera* Lam. On Systemic and Local Anaphylaxis. **Journal of Immunotoxicology**, v. 4, p. 287-294, 2007b.

MAJNO, G.; PALADE, G.E. Studies on inflammation: I. The Effect of Histamine and Serotonin on Vascular Permeability: An Electron Microscopic Study. **Journal of Cell Biology**, v. 11, p. 571-605, 1961.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. **Journal of Agricultural Science, Cambridge**, v. 128, p.331- 322, 1997.

MAKONNEN, E.; HUNDE, A.; DAMECHA, G. Hypoglycaemic effect of *Moringa stenopetala* aqueous extract in rabbits. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 147-148, 1997.

MALLEVIALLE, J.; BRICHET, A.; FIESSINGER, F. How safe are organic polymers in water treatment. **Journal of the American Water Works Association**, v. 76, p. 87–93, 1984.

MASUKO, T., MINAMI, A., IWASAKI, N., MAJIMA, T., NISHIMURA, S. I., LEE, Y. C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, p. 69-72, 2005.

MATOS, F.J.A. Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetados para pequenas comunidades. 3. ed. Fortaleza: EUFC, p. 220, 1998.

MATSUDA, K.; AOKI, J.; UCHIDA M.K.; SUZUKI-NISHIMURA, T. *Datura stramonium* agglutinin released histamine from rat peritoneal mast cells that was inhibited by pertussis toxin, haptenic sugar and N-acetyl-glucosamine specific lectins: Involvement of glycoproteins with N-acetylglucosamine residues. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 66, p. 195–204, 1994.

MATTHEWS, D.M. Protein absorption. **Journal of Clinical Pathology**, v. 5, p. 29-40, 1971.

MAYHAN, W.G. Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheeks pouch in response to adenosine 5-diphosphate and bradykinin. **Inflammation**, v 16, p. 295-305, 1992.

MCDONALD, D.M.; THURSTON, G.; BALUK, P. Endothelial Gaps as Sites for Plasma Leakage. **Inflammation Microcirculation**, v. 6(1), p. 7-22, 1999.

MCEVER, R.P. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, p. 581-586, 2002.

MEHTA, L.K.; BALARAMAN, R.; AMIN, A.H.; BAFNA, P.A.; GULATI, O.D. Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86(2-3), p. 191-5, 2003.

MENDELL, J.R.; SAHENK, Z. Painful sensory neuropathy. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1243-1255, 2003.

MESQUITA, F.R.; CORRÊA, A.D.; ABREU, C.M.P.; LIMA, R.A.Z.; ABREU, A.F.B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31(4), p.1114-1121, 2007.

MILLER, M.R.; MEGSON, I.L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 305-321, 2007.

MIRANDA, E.F.; PRIETO, J.C.; PINARDI, G. Spinal synergy between nonselective cyclooxygenase inhibitors and morphine antinociception in mice. **Brain Research**, v. 1049, p. 165-170, 2005.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONTENEGRO, M.R., FRANCO, M. Patologia Processo gerais. São Paulo: Atheneu, p. 233, 1999.

MOREIRA, R. A., PERRONE, J. C. Purification and parcial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-787, 1977.

MORTON J.F. The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae): a boon to arid lands? **Journal of Economic Botany**, v. 45(3), p. 318-333, 1991.

MOTA, M. R. L., CRIDDLE, D. N., ALENCAR, N. M. N., GOMES, R. C., MEIRELES, A. V. P., GADELHA, T. S., GADELHA, C. A. A., OLIVEIRA, C. C., BENEVIDES, R. G., CAVADA, B. S., ASSREURY, A. M. S. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, p. 1-10, 2006

MUGHAL, M.H.S.; SRIVASTAVA, P.S.; IQBAL, M. Drumstick (*Moringa pterygosperma* Gaertn.): a unique source of food and medicine. **Journal of Economic and Taxonomic Botany**, v. 23, p. 47-61, 1999.

MUKHERJEE, D. Selective Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor and potential risk of cardiovascular events. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 817-821, 2002.

MÜLLER, W.A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Laboratory Investigation**, v. 82(5), p. 521-533, 2002.

MURAKAMI, A.; KITAZONZ, Y.; JIWAJINDA, S.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. Niaziminin, a thio carbamate from the leaves of *Moringa oleifera*, holds a strict structural requirement for inhibition of tumor promotor-induced Epstein-Barr virus activation, **Planta Medica**, v. 64, p. 319-323, 1998.

MURDOCK, L.L.; SHADE, R.E. Lectins and protease inhibitors as plant defense against insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6605-6611, 2002.

NAPIMOGA, M.H.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.N.; MOTA, M.L.; BITTENCOURT, F.S.; ALVES-FILHO, J.C.; GRESPAN, R.; GONÇALVES, R.B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; DE FREITAS, A.; PARADA, C.A.;

FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Lonchocarpus sericeus lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **International Immunopharmacology**, v. 7 (6), p. 824-35, 2007.

NDABIGENGESERE A.; NARASIAH, S.K.. Influence of operating parameters on turbidity removal by coagulation with *Moringa oleifera* seeds. **Environmental Technology**, v.17, p.1103-1112, 1996.

NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, S. K.; TALBOT, B.G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Research**, v. 29, p. 703-710, 1995.

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-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 379 (6), p. 609-16, 2009.

OKOLI, C.O.; AKAH, P.A.; NWAFOR, S.V.; ANISIOBI, A.I.; IBEGBUNAM, I.N.; EROJIKWE, O. Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* C.D. Adams. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109 (2), p. 219-225, 2007.

OLIVEIRA J.T.A., SILVEIRA S.B, VASCONCELOS I.M., CAVADA B.S., MOREIRA R.A. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79(6), p. 815-820, 1999.

OLSEN, A. Low technology water purification by bentonite clay and *Moringa oleifera* seeds flocculation as performed in Sudanese villages: effect on *Schistosoma mansoni* cercariae. **Water Research**, v. 21, p.517-522, 1987.

PAL, S.K.; MUKHERJEE, P.K.; SAHA, B.P. Studies on the Antiulcer Activity of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Gastric Ulcer Models in Rats. **Phytotherapy Research**, PTR 9.6, p. 463,1995.

PALADA, M.C. Moringa (*Moringa oleifera* Lam.): a versatile tree crop with horticultural potential in the Subtropical United States. **Horticulture Science**, v.31(5), p.233-234, 1996.

PALANISAMY, V.; KUMERASAN, M. Influence of seed treatments and containers on the viability of annual moringa seeds. **South Indian Horticulture**, New Delhi, v. 43(1-2), p. 42-43, 1985.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.

PEUMANS, W.J.; WINTER, H.C.; BEMER, V.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I.J.; TRUFFA-CACHI, P.; VAN DAMME, E.J.M. Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. **Glycoconjugate Journal**, v. 14, p. 259–265 1997.

PREET, K.; PUNIA, D. Proximate composition, phytic acid, polyphenols and digestibility (in vitro) of four brown cowpea varieties. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 51, p. 189–193, 2000.

PUSZTAI, A. General effects on animal cells. In: Puztai, A., Editor, 1991. **Plant Lectins**, Cambridge University Press, Cambridge, p. 105–205, 1991.

PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S.; EWEN, S.W. Uses of plant lectins in bioscience and biomedicine. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 1130–1140, 2008.

PUSZTAI, A.; GRANT, G.; SPENCER, R.J.; DUGUID, T.J.; BROWN, D.S.; EWEN, S.W.B.; PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M.; BARDOCZ, S. Kidney bean lectin-induced *Escherichia coli* overgrowth in the small-intestine is blocked by GNA, a mannose-specific lectin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 360–368, 1993.

RAIKHEL, N.V.; LEE, H.-I. Structure and function of chitin-binding proteins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 591–615, 1993.

RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall, P.D.; Melzack, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres. p. 1-8, 1999.

RAMACHANDRAN C., PETER K.V., GOPALAKRISHNAN P.K. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. **Journal of Economic Botany**, v.34(3) p. 276-283, 1980.

RAMOS, S. J.; FERNANDES, L. A.; MARQUES, C.C.L.; SILVA, D.D.; PALMEIRA, C.M.; MARTINS, E.R. Produção de matéria seca e óleo essencial de menta sob diferentes doses de fósforo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.1, p.9-12, 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Farmacologia. 6^a ed., Elsevier, 2007.

RASHID U.; ANWAR F.; MOSER B.R.; KNOTHE G. *Moringa oleifera* oil: A possible source of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8175-8179, 2008.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Sialic acid binding lectins from leaf of mulberry (*Morus alba*). **Plant Science**, v. 139, p. 141–148, 1998.

REICHERT J.M. Trends in development and approval times for new therapeutics in the United States. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 695–702, 2003.

REISFIELD, R.A.; LEWIS, U.J.; WILLIAMS, D.E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamide gels. **Nature**, v. 195, p. 281-283, 1962.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zimozan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p.111-118, 2000.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. As Bases Patológicas das Doenças. Cap 3: Inflamação e reparo. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.48-79, 2005.

RUCKMANI, K.; KAVIMANI, S.; ANANDAN, R.; JAYKAR, B. Effect of *Moringa oleifera* Lam on paracetamol-induced hepatotoxicity. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. 33-35, 1998.

SANGHI, R.; BHATTTACHARYA, B.; SINGH, V. *Cassia angustifolia* seed gum as an Effective natural coagulant for decolourisation of dye solutions. **Green Chemistry**, v. 4, p. 252–254, 2002.

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C.A.; ARAGÃO, K.S.; OLIVEIRA, C.C.; MOTA, M.R.L.; GOMES, R.C.; DE FREITAS, P.A.; TOYAMA, M.H.; DE OLIVEIRA, T.D.; ALENCAR, N.M.N.; CRIDDLE, D.N.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S.; Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seeds lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p. 1050-1055, 2006.

SANTOS, A.F.S.; LUZ, L.A.; ARGOLO, A.C.C; TEIXEIRA, J.A.; PAIVA, P.M.G; COELHO, L.C.B.B. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508, 2009.

SASHIDHARA, K.V.; ROSAIAH, J.N.; TYAG, E.; SHUKLA, R.; RAGHUBIR, R.; RAJENDRAN, S.M. Rare dipeptide and urea derivatives from roots of *Moringa oleifera* as potential anti-inflammatory and antinociceptive agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 432-436, 2009.

SATHE , S.K. Solubilization, electrophoretic characterization and *in vitro* digestibility of almond (*Prunus amygdalus*) proteins. **Journal of Food Biochemistry**, v. 16, p. 249-264, 1993.

ŠĆIBAN, M.; KLAŠNJA, M.; ANTOV, M.; ŠKRBIĆA, B. Removal of water turbidity by natural coagulants obtained from chestnut and acorn. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6639-6643, 2009.

SGARBIERI, V.C. Propriedades nutricionais das proteínas. In: Sgarbieri, V.C., Editor, 1996. **Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradações e Modificações**, Livraria Varela Ltda, São Paulo, p. 337–386, 1996.

SHARMA, P.; KUMARI, P.; SRIVASTAVA, M.M.; SRIVASTAVA, S. Removal of cadmium from aqueous system by shelled *Moringa oleifera* Lam. seed powder. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 299-305, 2006.

SILVA, A. R.; KERR, W.E. Moringa: uma nova hortaliça para o Brasil. Uberlândia: UFU/DIRIU, p. 95 p 1999.

SINGH U, SINGH B. Tropical grain legumes as important human food. **Economic Botany**, v. 46(3), p. 310-2, 1992.

SIQUEIRA, J.R.; DANTAS, C.J.S. Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação. Rio de Janeiro: Medsi, p. 238, 2000.

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

STILLMARK, H. Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Arb. Pharmak. Inst. Dorpat, v. 3, p. 59–151, 1888.

STROHL, W.R.; KNIGHT, D.M.; Discovery and development of biopharmaceuticals: current issues. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 668-672, 2009.

SULAIMAN, M.R.; ZAKARIA, Z.A.; BUJARIMIN, A.S.; SOMCHIT, M.N.; ISRAF, D.A.; MOIN, S. Evaluation of *Moringa oleifera* Aqueous Extract for Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities in Animal Models. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, p. 838 – 845, 2008.

THEIS, T.; STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p.437-455, 2004.

TOMAZON, C.J.; MANTOVANI, L.E.; BITTENCOURT, A.V.L.; DA ROSA, E.F.F. Utilização de medidas de turbidez na quantificação da movimentação de sólidos por veiculação hídrica nas bacias dos rios Anta Gorda, Brinco, Coxilha Rica e Jirau – Sudoeste do Estado do Paraná. **Boletim Paranaense de Geociências**, v. 57, p. 49-56, 2005.

TOMISATO, W.; TSUTSUMI, S.; HOSHINO, T.; HWANG, H.J.; MIO, M.; TSUCHAIYA, T.; MIZUSHAIMA, T. Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 575-585, 2004.

TRINDADE, M.B.; LOPES, J.L.; COSTA, A.S.; MOREIRA, A.C.M.; MOREIRA, R.A.; OLIVA, M.L.V.; BELTRAMINI, L.M. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 146-152, 2006.

USDA (United States Department of Agriculture). Natural Resources Conservation Service (NRCS). **Plants Database**. Disponível em: <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=MOOL&display=31> Acesso em: 15 Jan 2009.

UNITED NATIONS WORLD FOOD PROGRAMME. Interactive Hunger Map. Disponível em: www.wfp.org/country_brief/unger_map/map/hungermap_popup/map_popup.html Acesso em 13 Fev, 2010.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; PUSZTAI, A. AND BARDOCZ, S. eds. Handbook of plant lectins: Properties and biochemical applications. **John Wiley and Sons**, Chichester, UK. 1998.

VAN DAMME, E.J.M.; HAO, Q.; CHARELS, D.; BARRE, A.; ROUGE, P.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W.J. Characterization and molecular cloning of two different type 2 ribosome-inactivating proteins from the monocotyledonous plant *Polygonatum multiflorum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 2746–2759, 2000.

VAN HINSBERG, V.W.; VAN NIEUW, A.G.P. Intracellular signalling involved in modulating human endothelium barrier function. **Journal of Anatomy**, v. 200, p. 549, 2002.

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

VANDERLEI, E.S.O. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (vahl) c. agardh var. *Lycopodium* em animais. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** – Universidade Federal do Ceará, 2008.

VASCONCELOS, I.M.; MAIA, A.A.B.; SIEBRA, E.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.F.U.; MELO, V.M.M.; CARLINI, C.R.; CASTELAR, L.I.M. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 1–8, 2001.

VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, p. 385-403, 2004.

WHITTLE, B. A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and non-narcotic analgesic. **British Journal Pharmacology and Chemoterapy**, v. 22, p. 246-253, 1964.

WANG, X.; LI, X.; LI, Y. A modified Coomassie Brilliant Blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. **Biotechnology Letters**, v. 29 (10), p. 1599-603, 2007.

ZACHARIUS, R.M.; ZELL, T.E.; MORRISON, J.H.; WOODLOCK, J.J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 30, p. 148-152, 1969.

ZHANG, L.; HSU, C. H.; ROBINSON, C. P. Effects of ricin administration to rabbits on the ability of their coronary arteries to contract and relax in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 129, p. 16-22, 1994.

ZHANG, N.; PING, Q.N.; HUANG, G.H.; XU, W.F. Investigation of lectinmodified insulin liposomes as carriers for oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 247–259, 2005.

ZHANG, Y.; KENSLER, T.W.; CHO, C.G.; POSNER, G.H.; TALALAY, P. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 3147-3150, 1994.

APÊNDICE

Artigo submetido ao periódico Journal of Ethnopharmacology como um dos requisitos para conclusão do curso de Mestrado em Bioquímica

**Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a chitin-binding protein isolated from
Moringa oleifera Lam. seeds**

Mirella L. Pereira, Hermógenes D. Oliveira^{*}, Juliana M. Gifoni, José T.A. Oliveira, Raquel O.

Rocha, Daniele O. B. Sousa, Ilka M. Vasconcelos^{*}

^aDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, CEP 60451-970, Brazil

* Corresponding authors. Tel.: + 55 85 3366 9822; Fax: + 55 85 3366 9789.

E-mail addresses: imvasco@ufc.br (I.M. Vasconcelos), hermogenesdavid@yahoo.com.br (H.D. Oliveira)

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Moringa oleifera* Lam. is a perennial multipurpose tree that has been successfully used in folk medicine to cure several inflammatory processes.

Aims of the study: To purify and characterize a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, named *Mo*-CBP₄, and evaluate its antinociceptive and anti-inflammatory effects *in vivo*.

Materials and methods: *Mo*-CBP₄ was purified by affinity chromatography on chitin followed by ion exchange chromatography. Acetic acid-induced abdominal constrictions assay was used for the antinociceptive and anti-inflammatory activity assessments.

Results: *Mo*-CBP₄ is a glycoprotein (2.9% neutral carbohydrate) composed of two protein subunits with apparent molecular masses of 28 and 18 kDa (9 kDa in the presence of reducing agent). The intraperitoneal injection of *Mo*-CBP₄ (3.5 and 10 mg/kg) into mice potently and significantly reduced the occurrence of abdominal writhing in a dose dependent manner by 44.7% and 100%, respectively. In addition, the oral administration of the protein (10 mg/kg) resulted in 18% and 52.8% reductions in abdominal writhing when given 30 and 60 min prior to acetic acid administration, respectively. *Mo*-CBP₄ also caused a significant and dose-dependent inhibition of peritoneal capillary permeability induced by acid acetic and significantly inhibited leukocyte accumulation in the peritoneal cavity.

Conclusion: Data of this pioneering study describes that the chitin-binding protein *Mo*-CBP₄, from *M. oleifera* seeds, exhibits anti-inflammatory and antinociceptive properties and scientifically supports the use of this multipurpose tree in folk medicine.

Keywords: *Moringa oleifera*; chitin-binding protein; protein purification; antinociceptive effect; anti-inflammatory activity.

1. Introduction

Moringa oleifera Lam. (drumstick tree, horseradish tree), a multipurpose tree native to Northern India that grows well throughout the tropics, is widely cultivated in East and Southeast Asia, West Indies and in some areas of South America, such as Northeast Brazil (Ramachandran et al., 1980; Jahn et al., 1986). It belongs to the Moringaceae family, which comprises 14 species of deciduous trees classified in a single genus, namely, *Moringa* (Ramachandran et al., 1980; Chuang et al., 2007). It is a perennial tree that grows rapidly, even in poor soil, and is affected minimally by drought and pests. It is also considered relatively safe for medicinal uses (Anwar and Bhanger, 2003; Adedapo et al., 2009).

Indeed, a large number of reports exist regarding successful traditional use of many parts of the *M. oleifera* tree to cure several diseases in folk medical practices. Detailed studies have also been published in an attempt to understand the mechanisms underlining its curative power *in vitro* (cultured cells) and *in vivo* (animal); among the reported benefits, hypotensive, anti-inflammatory, anti-tumour, antibiotic, antitrypanosomal, antinociceptive, antiulcer, hypocholesterolemic and hypoglycemic activities have been assayed (Faizi et al., 1995; Ezeamuzle et al., 1996; Murakami et al., 1998; Chuang et al., 2007; Chumark et al., 2008; Jaiswal et al., 2009).

In particular, the anti-inflammatory and antinociceptive properties were demonstrated when orally administered preparations of hot water infusions of *M. oleifera* seeds significantly inhibited carrageenan-induced edema and acetylcholine-induced contraction (Caceres et al., 1992). Ezeamuzle and colleagues (1996), motivated by an incident when a traditional healer in Kuwait successfully used a topically applied, freshly ground root preparation of *M. oleifera* to

treat a large trauma-initiated chronic inflammatory swelling of the ankle, demonstrated the anti-inflammatory property of roots using various experimental animal models. It was also discovered that *M. oleifera* leaves possess peripherally-non-opioid-mediated and centrally-opioid-mediated antinociceptive and anti-inflammatory activities (Sulaiman et al., 2008). Moreover, recent studies have revealed that a rare dipeptide (aurantiamide acetate) and a urea derivative (1,3-dibenzyl urea) isolated from *M. oleifera* roots exhibit anti-inflammatory and antinociceptive effects through inhibition of TNF- α and IL-2 production (Sashidhara et al., 2008). Nevertheless, in spite of strong scientific evidence of the curative power of *M. oleifera*, additional studies emphasising isolation and characterisation of bioactive compounds are crucial for two principle reasons: (i) to scientifically support the use of *M. oleifera* for antinociceptive and anti-inflammatory purposes and (ii) to elucidate the mechanism of action of *M. oleifera*'s traditional therapeutic benefits leading to control of nociceptive and inflammatory processes.

In the present work we report, for the first time, the purification of *Mo*-CBP₄, a chitin-binding protein found in *M. oleifera* seeds that exhibits potent antinociceptive and anti-inflammatory properties in mice.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Moringa oleifera seeds were harvested from trees at Campus do Pici of Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, Brazil. A voucher specimen (No. EAC34591) was deposited in the Prisco Bezerra Herbarium, UFC.

2.2. Experimental animals

Male Swiss mice, weighing 25-35 g, were provided by the Animal House of UFC. The animals were housed in groups of six in standard cages at room temperature (25 ± 3 °C) and exposed to a 12 h dark/12 h light cycle; both food and water were offered *ad libitum*. Twelve hours before experimentation, they were transferred to the laboratory and housed only with water *ad libitum*. The experimental protocols were performed in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals, reviewed and approved by the Animal Ethics Committee (CEPA) of UFC, Brazil.

2.3. Preparation of *M. oleifera* seed extract

Mature seeds were ground in a coffee grinder fitted with a 1-mm mesh screen and the resulting flour was treated with *n*-hexane (1:10, w/v). Seed protein extract was prepared by mixing 30 g of defatted *M. oleifera* flour with 300 ml of 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.15 M NaCl under agitation at 4 °C for 4 h. The **suspension was filtered through** a layer of **cheesecloth**, and the filtrate centrifuged at $15,000 \times g$ and 4 °C for 30 min. Crude protein extract was stored at 4 °C until separated chromatographically.

2.4. Purification of chitin-binding proteins

Crude protein extract was exhaustively dialysed against Milli-Q grade water and the insoluble material was removed by centrifugation at $15,000 \times g$ and 4 °C for 30 min. The

supernatant (albumins) was recovered and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ultra-pure) was added to 90% saturation. The resulting precipitate was separated by centrifugation as before, but for 40 min, and dissolved with 20 ml of 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.15 M NaCl. Excess $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was removed by dialysis (MW cut-off of 12,000 D) against the aforementioned buffer, and the protein fraction was applied (10 ml; 575 mg protein) to a chitin affinity column. The column was percolated with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.15 M NaCl, until unbound proteins were completely removed. Bound proteins were eluted by first applying the above Tris buffer containing 0.1 M *N*-acetyl-D-glucosamine (NAG) followed by 0.05 M acetic acid. Elution peaks corresponding to retained proteins were named P_{NAG} and P_{AC} , respectively.

A sample of 15 mg P_{NAG} was dissolved in 2 ml of 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.2, dialysed against the same solution, centrifuged at $15,000 \times g$ and 4 °C for 15 min, and the clean supernatant was applied to a **cation-exchange (Resource S™)** matrix previously equilibrated with the buffer from above and attached to an FPLC system (GE Healthcare). Five major protein peaks ($Mo\text{-CBP}_1$, $Mo\text{-CBP}_2$, $Mo\text{-CBP}_3$, $Mo\text{-CBP}_4$ and $Mo\text{-CBP}_5$) were recovered using the equilibrium buffer followed by stepwise elution with 0.4, 0.5, 0.6 and 0.7 M NaCl, respectively.

2.5. Polyacrylamide gel electrophoresis

The purity and molecular mass of the chitin-binding protein $Mo\text{-CBP}_4$ from *M. oleifera* was carried out under denaturing conditions (SDS-PAGE) using the discontinuous electrophoresis method described by Laemmli (1970). A 15% polyacrylamide gel in 0.025 M Tris-HCl, pH 8.8, containing 0.2 M glycine and 1% sodium dodecyl sulphate (SDS), was mounted in a vertical electrophoresis system. Samples and molecular weight standards were prepared in 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing 0.1% SDS, in the presence or absence of 1% 2-

mercaptoethanol, and boiled at 98 °C for 10 min before loading on the gel. Electrophoresis was performed with a constant current of 20 mA for approximately 4 h.

2.6. Protein and carbohydrate content

Protein content was determined using the method described by Bradford (1976) with bovine serum albumin as standard. Absorbance at 280 nm was also used to determine the protein content of column eluates. The neutral carbohydrate content of *Mo*-CBP₄ was estimated by the phenol-sulphuric acid method with D-glucose as a reference (Dubois et al., 1956, modified by Masuko et al., 2005). The presence of carbohydrate was also evaluated by specific staining of the *Mo*-CBP₄ band after SDS-PAGE using the Glycoprotein Detection Kit (Sigma).

2.7. Haemagglutination activity

Serial twofold dilutions of 0.1 mg/100 µL of *Mo*-CBP₄ in phosphate buffered saline (100 µL) were incubated with 100 µL of a 2% erythrocyte suspension and cell agglutination was scored after 1 h at 37 °C. Haemagglutination activity was assayed against rabbit and human ABO erythrocytes (Vasconcelos et al., 1997).

*2.8. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the purified chitin-binding protein from *M. oleifera* (*Mo*-CBP₄)*

Antinociceptive activity of *Mo*-CBP₄ was quantified using the writhing test (Koster et al., 1959). Briefly, control animals were intraperitoneally (i.p.) injected with 0.8% acetic acid (10 ml/kg) and the number of abdominal constrictions registered during 20 min; the

monitoring period was initiated 10 min after acetic acid injection. Test animals were treated with *Mo*-CBP₄ at doses of 1, 3.5 and 10 mg/kg given i.p. 60 min before acetic acid injection. Indomethacin (10 mg/kg) was administered (i.p.) to mice as a positive control. To check whether *Mo*-CBP₄ possess oral antinociceptive activity, it was orally given (10 mg/kg) to animals 30 or 60 min prior to acetic acid injection. A significant reduction of the writhing number with any treatment, as compared to controls, was considered a positive analgesic response.

To evaluate the effect of *Mo*-CBP₄ on acid acetic-induced vascular permeability, it was administered to mice (i.p.) and chased 30 min later by injection (i.v.) with a 25 mg/kg saline solution of Evans Blue (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Thirty minutes later, acetic acid was injected (i.v.), and after an additional 10 min, the number of abdominal contractions counted during a 20 min-period. Immediately following the test, mice were sacrificed by cervical dislocation and the peritoneal cavity was washed with 2 ml of sterile saline plus heparin (25 IU/ml). Washes were collected, centrifuged at 1000 rpm for 10 min, and the absorbance of the supernatant at 610 nm was recorded. Peritoneal capillary permeability induced by acetic acid is expressed in µg/ml dye leaked into the peritoneal cavity based on a standard curve of known concentrations of Evans Blue (Lucena et al., 2007). Anti-inflammatory effects were also evaluated by counting the number of total leukocytes in the peritoneal lavage fluid using a Neubauer chamber after diluting the sample with Türk solution (1:20, v/v).

To assess the involvement of NAG on the antinociceptive and anti-inflammatory activities, *Mo*-CBP₄ was incubated with 0.15 M NAG for 30 min at 37 °C followed by injection into a mouse (10 mg/kg, i.p. or v.o.) 60 min prior to acetic acid injection. Control animals received saline (0.15 M NaCl) or 0.15 M NAG in saline.

2.9. Statistical analysis

The results are presented as the mean \pm S.E.M. Statistical comparison of the data was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test or by use of the Student's unpaired *t*-test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

3. Results and Discussion

A chitin-binding protein was isolated from *M. oleifera* seeds by affinity chromatography followed by ion exchange chromatography. The albumin fraction obtained from crude seed extract, after precipitation with 90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, was applied to a chitin column and two retained fractions (P_{NAG} and P_{AC}) were eluted with 0.1 M NAG (P_{NAG}) and 0.05 M acetic acid in equilibration buffer, respectively (Fig. 1). Further fractionation of P_{NAG} was achieved after cation exchange chromatography on a Resource S matrix, as typically shown in Fig. 2A. Four major retained peaks ($Mo\text{-CBP}_2$, $Mo\text{-CBP}_3$, $Mo\text{-CBP}_4$ and $Mo\text{-CBP}_5$) were eluted with 0.4, 0.5, 0.6 and 0.7 M NaCl in equilibration buffer, respectively. $Mo\text{-CBP}_4$, the protein selected for further analyses in this study, represents about 1.17 mg per gram of flour and is obtained in 0.54% from crude seed extract (Table 1).

SDS-PAGE analysis in the absence of 2-mercaptoethanol revealed that $Mo\text{-CBP}_4$ is composed of two protein bands with apparent molecular masses of 28 and 18 kDa. However, in the presence of the reducing agent, a single protein band with apparent molecular mass of 9 kDa was observed (Fig. 2B). These findings suggest that a 9 kDa monomer associates into dimer and trimer species under non-reducing conditions most likely through interchain disulfide bonds. Similar electrophoretic behaviour was observed for haemagglutinin isolated from *M. oleifera* seeds (MoL). A single 7.1 kDa band observed by SDS-PAGE in the presence of 2-mercaptoethanol corresponded to a monomer, which in the absence of the reducing agent, associates into both a 13.6 kDa dimer and 27.1 kDa tetramer (Katre et al., 2008).

$Mo\text{-CBP}_4$ is a glycoprotein, as confirmed by its reactivity with periodic acid/Shiff reagent (Fig. 2C), that contains 2.9% neutral carbohydrate. Contrary to MoL , which contains 1.5% neutral sugar (Katre et al., 2008), the purified chitin-binding protein $Mo\text{-CBP}_4$ did not agglutinate human or rabbit erythrocytes. This indicates that this protein has just a single

binding site for carbohydrate and thus constitutes a merolectin (Peumans and Van Damme, 1995). Many proteins and peptides have been isolated from different parts of *M. oleifera*. From seeds, cationic and acidic hololectins with flocculating activity (Gassenschmidt et al., 1995; Ndabigengesere et al., 1995; Santos et al., 2005, 2009; Katre et al., 2008) and an antioxidant protein (Santos et al., 2005) have been described. In roots, a rare dipeptide with anti-inflammatory and antinociceptive activities was purified (Sashidhara et al., 2008). However, to our knowledge, this is the first report of the presence in *M. oleifera* of a non-agglutinating chitin-binding glycoprotein containing a unique carbohydrate binding domain.

Pharmacological tests showed that intraperitoneal injection (3.5 and 10 mg/kg) of *Mo*-CBP₄ into mice potently and significantly ($p < 0.05$) reduced the occurrence of abdominal writhing in a dose dependent manner by 44.7% and 100%, respectively (Fig. 3A). Remarkably, the potency of this protein, without induction of apparent acute toxicity or gastric damage within 24 h after administration, was similar to that of indomethacin (89.2% writhing inhibition), a well-known anti-inflammatory agent. Moreover, oral administration of the protein to mice (10 mg/kg) resulted in 18% and 52.8% reductions in abdominal writhing when given 30 and 60 min prior to acetic acid administration, respectively (Fig. 4).

Interestingly, the above doses of *Mo*-CBP₄ also caused (Fig. 3B) a significant ($p < 0.05$) and dose-dependent inhibition of peritoneal capillary permeability induced by acid acetic and significantly inhibited ($p < 0.05$) leukocyte accumulation in the peritoneal cavity (Fig. 3C).

It has been postulated that acetic acid acts indirectly by inducing the release of endogenous mediators, such as PGE₂ (prostaglandin E₂) and PGF_{2 α} in peritoneal fluids, as well as lipooxygenase products. It also causes the release of some cytokines, such as TNF- α , interleukin-1 β and interleukin-8 via modulation of macrophages and mast cells localised in the peritoneal cavity, which stimulate the nociceptive neurons sensitive to non-steroidal anti-inflammatory drugs (Ribeiro et al., 2000). Therefore, the inhibitory action of *Mo*-CBP₄ on acetic

acid-induced writhing in mice might be due to inhibition of cytokine release and/or lipooxygenase and cyclooxygenase inhibition in peripheral tissues thereby reducing prostaglandin synthesis and interfering with the mechanism of transduction in primary afferent nociceptors. With regard to the anti-inflammatory effect of *Mo*-CBP₄, it might be related to inhibition of leukocyte migration into the mouse peritoneal cavity.

According to Alencar et al. (1999), NAG-containing glycoconjugates are essential for neutrophil recruitment in different models of inflammation. However, it is unlikely that the antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Mo*-CBP₄ are mediated by its NAG recognition domain since incubation with 0.15 M of NAG (a similar concentration used to elute *Mo*-CBP₄ from the chitin column) did not inhibit those responses (data not shown).

In conclusion, this pioneering study describes the presence of a chitin-binding protein isolated from *M. oleifera* seeds that exhibits anti-inflammatory and antinociceptive properties and scientifically supports the use of this multipurpose tree in folk medicine.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROCAD) and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

References

Adedapo, A.A., Mogbojuri, O.M., Emikpe, B.O., 2009. Safety evaluations of the aqueous extract of the leaves of *Moringa oleifera* in rats. *Journal of Medicinal Plants Research* 3, 586-591.

- Alencar, N.M.N., Teixeira, E.H., Assreuy, A.M.S., Cavada, B.S., Flores, C.A., Ribeiro, R.A., 1999. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. *Mediators Inflammation* **8**, 107-113.
- Anwar, F., Bhangar, M.I., 2003. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions of Pakistan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 6558-6563.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Cáceres, A., Saravia, A., Rizzo, S., Zabala, L., De Leon, E., Nave, F., 1992. Pharmacologic properties of *Moringa oleifera*. II: Screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. *J Ethnopharmacology* **36**, 233-237.
- Chuang, P-H., Lee, C-W., Chou, J-Y., Murugan, M., Shieh, B-J., Chen, H-M., 2007. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresource Technology* **98**, 232-236.
- Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y., Phornchirasilp, S., Morales, N.P., Phivthong-ngam, L., Ratanachamnong, P., Srisawat, S., Pongrapeeporn, K.S., 2008. The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaves. *Journal of EthnoPharmacology* **116**, 439-446.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356.
- Ezeamuzle, I.C., Ambadederomo, A.W., Shode, F.O., Ekwebelem, S.C., 1996. Anti-inflammatory effects of *Moringa oleifera* root extract. *International Journal of Pharmacognosy* **34**, 207-212.

Faizi, S., Siddiqui, B.S., Saleem, R., Siddiqui, S., Aftab, K., Gilani, A.H.,1995. Fully acetylated carbonate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. *Phytochemistry* 38, 957-963.

Gassenschmidt, U., Jany, K.D., Tauscher, B., Niebergall, H., 1995. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. *Biochemistry Biophysical Acta* 1243, 477-481.

Jahn, S.A.A., Musnard, H.A., Burgstaller, H., 1986. The tree that purifies water: Cultivating multipurpose Moringaceae in Sudan. *Unasylva* 38, 23-28.

Jaiswal, D., Rai, P.K., Kumar, A., Mehta, S., Watal, G., 2009. Effect of *Moringa oleifera* Lam. Leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 123, 392-396.

Katre, U.V., Suresh, C.G., Khan, M.I., Gaikwad, S.M., 2008. Structure-activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. *International Journal of Biological Macromolecules* 42, 203-207.

Koster, R., Anderson, M., De Beer, E.J., 1959. Acetic acid-induced analgesic screening. *Federation Proceedings* 18, 412-430.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 679-685.

Lucena, G.M.R.S., Gadotti, V.M., Maffi, L.C., Silva, G.S., Azevedo, M.S., Santos, A.R.S., 2007. Antinociceptive and anti-inflammatory properties from the bulbs of *Cypura paludosa* Aubl. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 19-25.

Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S-I., Lee, Y.C., 2005. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry* 339, 69-72.

Murakami, A., Kitazono, Y., Jiwajinda, S., Koshimizu, K., Ohigashi, H., 1998. Niaziminin, a thiocarbamate from the leaves of *Moringa oleifera*, holds a strict structural requirement for inhibition of tumor-promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Planta Medica* 64, 319-323.

Ndabigengesere, A., Narasiah, S.K., Talbot, B.G., 1995. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. *Water Research* 29, 703-710.

Peumans, W.J., Van Damme E.J.M., 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109, 347-352.

Ramachandran, C., Peter, K.V., Gopalakrishnan, P.K., 1980. Drumstick (*Moringa oleifera*): A Multipurpose Indian Vegetable. *Economic Botany* 34, 276-283.

Ribeiro, R.A., Vale, M.L., Thomazzi, S.M., Paschoalato, A.B., Poole, S., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal of Pharmacology* 387, 111-118.

Santos, A.F.S., Argolo, A.C.C., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2005. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water Research* 39, 975-980.

Santos, A.F.S., Luz, L.A., Argolo, A.C.C. Teixeira, J.A., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 2009. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. *Process Biochemistry* 44, 504-508.

Sashidhara, K.V., Rosaiah, J.N., Tyagi, E., Shukla, R., Raghubir, R., Rajendran, S.M., 2009. Rare dipeptide and urea derivatives from roots of *Moringa oleifera* as potential anti-inflammatory and antinociceptive agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44, 432-436.

Sulaiman, M.R., Zakaria, Z.A., Bujarimin, A.S., Somchit, M.N., Israf, D.A., Moin, S. 2008. Evaluation of *Moringa oleifera* aqueous extract for antinociceptive and anti-inflammatory activities in animal models. *Pharmaceutical Biology* 46, 838-845.

Vasconcelos, I.M., Siebra, E.A., Maia, A.A.B., Moreira, R.A., Neto, A.F., Campelo, G.J.A., Oliveira, J.T.A., 1997. Composition, toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of Brazilian soybean (*Glycine max*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75, 419-426.

Figure Legends

Fig. 1. Affinity chromatography. The seed albumin fraction (575 mg protein) was applied to a chitin column (3.0 × 31.0 cm) previously equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 150 mM NaCl. Peak 1 (PI) is composed of unabsorbed proteins eluted (60 ml/h) with the equilibrium buffer; Chitin absorbed peak 2 (P_{NAG}) and peak 3 (P_{AC}) were eluted, respectively, with 0.1 M *N*-acetyl-D-glucosamine (arrow) and 0.05 M acetic acid (arrow). Fractions (2.2 ml) were collected at a flow rate of 60 ml/h and the eluted protein peaks were monitored at 280 nm.

Fig. 2. (A) Cation exchange chromatography. The chitin absorbed protein fraction eluted with 0.1 M *N*-acetyl-D-glucosamine (P_{NAG} ; 15 mg protein) was applied to a Resource S column (1 ml) previously equilibrated with 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.2. The flow-through fraction was eluted with equilibration buffer (Mo -CBP₁). The absorbed protein peaks (Mo -CBP₂, Mo -CBP₃, Mo -CBP₄ and Mo -CBP₅) were eluted, respectively, with 0.4, 0.5, 0.6 and 0.7 M NaCl in equilibration buffer. Mo -CBP represents the purified chitin-binding proteins from *M. oleifera* seeds. Fractions (2.0 ml) were collected at a flow rate of 60 ml/h and the eluted protein peaks were monitored at 280 nm. **(B)** SDS-PAGE - Samples (10 µg of protein) were loaded on a 15% polyacrylamide gel and resolved with a constant current of 20 mA for approximately 4 h. Protein bands were stained with Coomassie Blue R250. Lane 1, molecular mass markers (Phosphorylase b - 97 kDa, bovine serum albumin - 66 kDa, ovalbumin - 45 kDa, carbonic anhydrase - 29 kDa, soybean trypsin inhibitor - 20.1 kDa and lactalbumin - 14.4 kDa); Lanes 2 and 3: Mo -CBP₄ under non-reduced and reduced (2-mercaptoethanol) conditions, respectively. **(C)** Mo -CBP₄ stained with Schiff's reagent.

Fig. 3. Pharmacological properties of *Mo*-CBP₄. **(A)** Inhibition of acetic-acid-induced writhing in mice; **(B)** Inhibition of peritoneal capillary permeability induced by acid acetic; **(C)** Inhibition of leukocyte accumulation in the peritoneal cavity of mice. Each value represents the mean \pm S.E.M. of six mice. Values are given as the mean \pm S.E.M. (n = 6). * $p < 0.05$ compared to control group.

Fig. 4. Effect of oral administration of *Mo*-CBP₄ on acetic acid-induced writhing in mice. Protein (10 mg/kg) was given to mice 30 or 60 min prior to acetic acid injection. Values are given as the mean \pm S.E.M. (n = 6). * $p < 0.05$ compared to control group.

Table 1

Yield of the chitin-binding protein *Mo*-CBP₄ from *Moringa oleifera* seeds at different purification steps

Step	Protein (mg/gF)	Yield (%) [*]
Crude extract	216.44 ± 4.72	100.0
Albumin	144.71 ± 1.74	66.85
F 0-90% (NH ₄) ₂ SO ₄	122.33 ± 2.04	56.47
P _{NAG} ^δ (Chitin)	6.50 ± 0.38	3.00
<i>Mo</i> -CBP ₄ (Resource S)	1.17 ± 0.07	0.54

Results are the mean ± standard deviation of six similar runs.

^{*} Recovered protein (mg) in each step of purification, from 1 g of *Moringa oleifera* seed flour.

^δ Chitin-binding protein fraction eluted by 0.1 M *N*-acetyl-D-glucosamine.

Figure 1. Pereira *et al.*, 2010

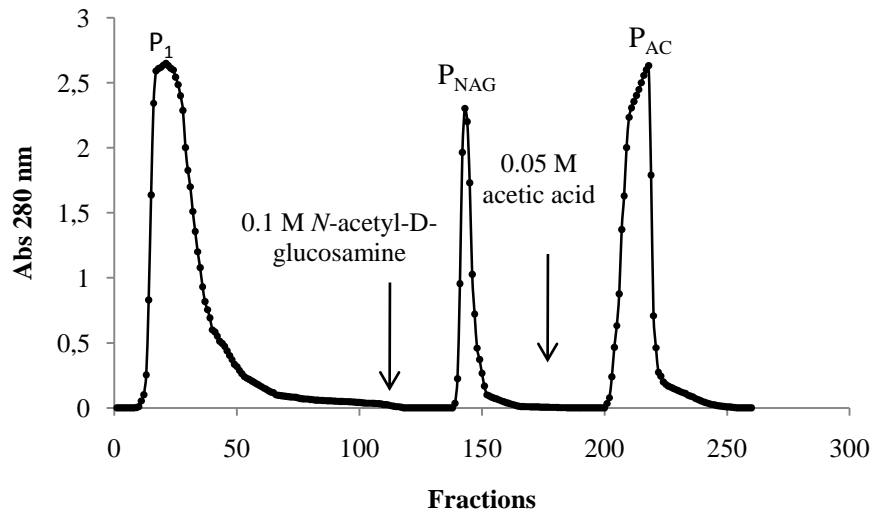


Figure 2. Pereira *et al.*, 2010

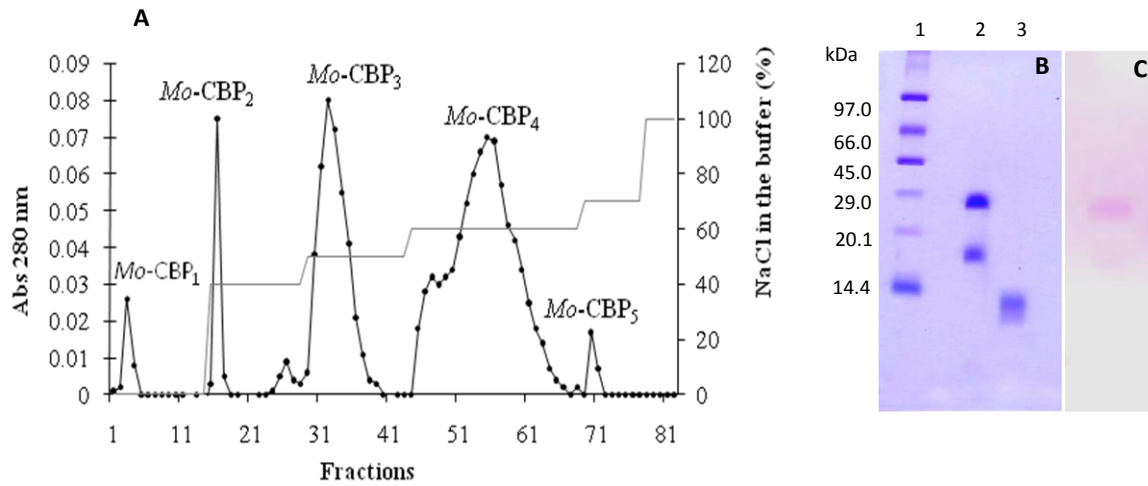


Fig. 3. Pereira *et al.*, 2010

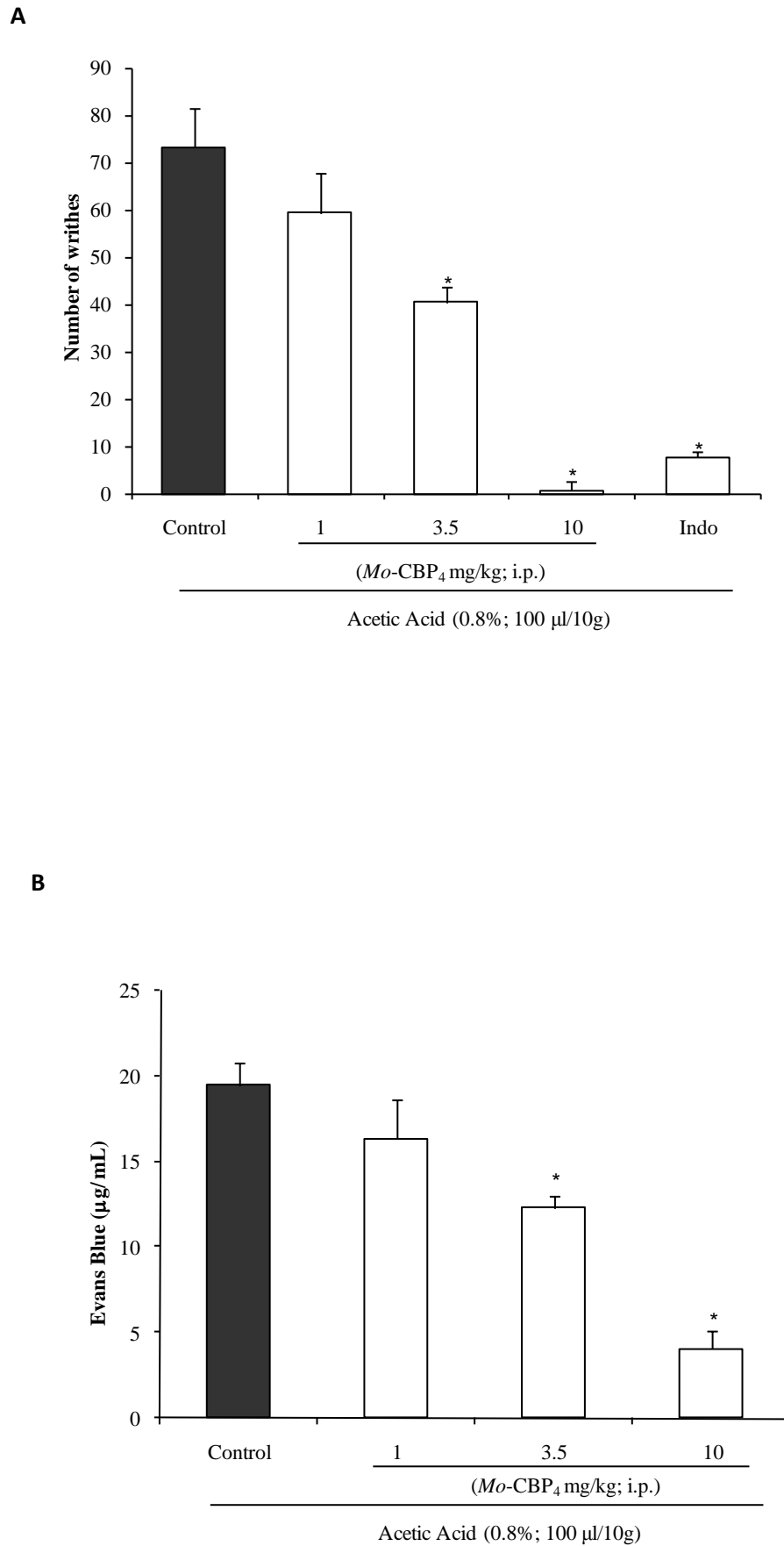


Fig. 3 (cont.) Pereira et al., 2010

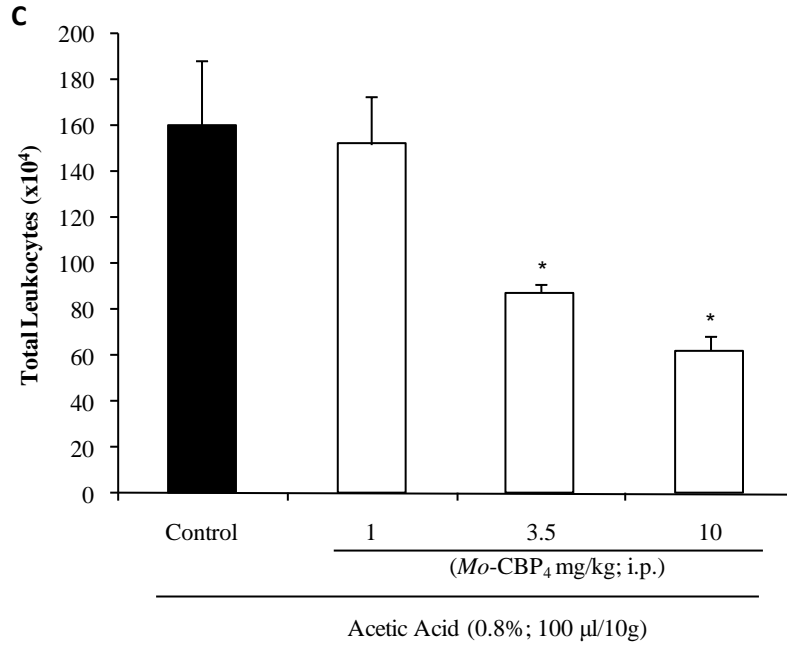


Fig. 4. Pereira et al., 2010

