



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

MAGDA LORENA TURBANO DOS SANTOS

**DETECÇÃO DA ATIVIDADE LECTÍNICA EM PLANTAS DO GÊNERO
HANDROANTHUS (SIN. *TABEBUIA*) E ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA DE
FRAÇÃO PROTEICA DE *HANDROANTHUS IMPETIGINOSUS***

MOSSORÓ-RN

2014

MAGDA LORENA TURBANO DOS SANTOS

**DETECÇÃO DA ATIVIDADE LECTÍNICA EM PLANTAS DO GÊNERO
HANDROANTHUS (SIN. *TABEBUIA*) E ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA DE
FRAÇÃO PROTEICA DE *HANDROANTHUS IMPETIGINOSUS***

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, Departamento de Ciências Animais, para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva – UFERSA.

MOSSORÓ-RN

2014

O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade de seus autores

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência

237d Santos, Magda Lorena Turbano dos.

Detecção da atividade lectínica em plantas do gênero *handroanthus* (*sin. tabebuia*) e atividade pró-inflamatória de fração proteica de *handroanthus impetiginosus*. / Magda Lorena Turbano dos Santos -- Mossoró, 2014.

46f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva.

Monografia (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Graduação.

1. Biotecnologia - Atividade pró-inflamatória. 2. Gênero *handroanthus*. 3. Atividade lectínica. I. Título.

RN/UFERSA/BCOT /295-14

CDD: 660.6

Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza Borba

MAGDA LORENA TURBANO DOS SANTOS

**DETECÇÃO DA ATIVIDADE LECTÍNICA EM PLANTAS DO GÊNERO
HANDROANTHUS (SIN. *TABEBUIA*) E ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA DE
FRAÇÃO PROTEICA DE *HANDROANTHUS IMPETIGINOSUS***

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido-UFERSA, Departamento de Ciências Animais, para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

APROVADA EM: 25 / 02 / 2014

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva
Presidente

Msc. Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra
Primeiro Membro

Bacharel em Biotecnologia, José Carlos da Silveira Pereira
Segundo Membro

Primeiramente a Deus, meu Guia,
minha fonte de coragem e fé, a
meus pais, Francisco Sales
Augusto dos Santos e Francisca
Neiriland Turbando do Santos,
meus exemplos de vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, que permitiu que tudo isso acontecesse; me dando graças sempre e mandando anjos para me guiar;

Aos meus pais, Sales e Neiriland, que se dedicaram e me apoiaram sem medir esforços nessa nova conquista, sempre incentivando e dando força para que eu não desistisse; à minha irmã, Larisse e meu cunhado/irmão Theogenes, que mesmo longe não deixaram de ser presentes a todo momento;

À toda minha Família, por serem o maior presente em minha vida, tenho a honra de ter nascido entre vocês. Em especial aos meus avós Maria Ducarmo e José Izidro, aos meus tios/compadres Anne e Eladio, a meu afilhado lindo Pedro Rian, e à minha prima e amiga Daniele Leite.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva, que com sua paciência me acolheu, durante toda a graduação, e acreditou no meu potencial; por indiretamente me ensinar a esperar sempre o melhor das pessoas e que não basta apenas termos conhecimento se não tivermos amor para colocá-lo em prática. Obrigada;

À Profa Dra Alexsandra Fernandes Pereira, pelo exemplo de pessoa e profissional que é; que sempre, sem medir esforços, estava preocupada com a nossa aprendizagem. Também por me acolher como minha orientadora do mestrado, nessa nova área e nova etapa da minha vida;

Aos professores do curso de Biotecnologia, em especial, Ana Carla, Karoline Soares, Marcos Sousa, Marcelino Viana, Isadora Louise, Fernanda Matias, Anabelle Batista, Lidianne Leal e Silvestre Brilhante. Por todo aprendizado durante a graduação;

Aos meus queridos do LABCEMOL, pela parceria e amizade que construímos durante todo esse tempo. Esse sentimento permanecerá, pois nós seremos sempre a família LABCEMOL. Em especial aos amigos, Carlos, Ronielly, Rosueti, Samara, Gillianne e Alanna.

Aos meus colegas e amigos de turma, Débora, Mário, Carla, Emanuela, Mirna, Caio, Hebert, Waleska, Joelma, Darlene e Luã, por compartilharem todos os momentos dessa nossa caminhada buscando ser os melhores biotecnologistas;

A minha família em Mossoró, Débora e Juliana, que sem elas não teria forças para continuar sozinha. Que me escutaram e me aturaram durante todo esse período, preenchendo um lugar muito especial na minha vida.

“Não são as espécies mais fortes que sobrevivem nem as mais inteligentes, e sim as mais suscetíveis a mudanças.”

Charles Darwin

RESUMO

A vegetação da Caatinga, bioma inserido na região semiárida, é bastante diversificada. Dentre as espécies dessa região encontram-se representantes do gênero *Handroanthus* (sin. *Tabebuia*) de reconhecido valor medicinal, cujas ações farmacológicas indicam a possível presença de lectinas, uma classe de proteínas com ampla aplicação biotecnológica. Nesse sentido, o trabalho teve como objetivo detectar atividade lectínica em plantas do gênero *Handroanthus* (sin. *Tabebuia*), bem como purificar parcialmente amostras letínicas, caracterizar e avaliar a resposta inflamatória de uma fração proteica obtida a partir de sementes de *H. impetiginosus*, em modelo de edema de pata e migração de leucócitos para a cavidade peritoneal em ratos. As farinhas obtidas de sementes de *H. caraiba* e *H. impetiginosus* foram submetidas à extrações a 10% (p/v) em solução salina (NaCl 0,15 M) e em soluções tamponantes; os extratos brutos em NaCl (EB) foram submetidos a ensaios de atividade hemaglutinante (AH) com eritrócitos glutarizados de coelho e humanos (grupo ABO) e a precipitações proteicas utilizando sulfato de amônio. Os resultados sugerem que as preparações obtidas a partir das espécies do gênero *Handroanthus* avaliadas possuem lectínas, uma vez apresentaram atividade lectínica. O melhor resultado foi obtido com o EB de *H. impetiginosus* em NaCl 0,15 M, que exibiu AH: 32.768^{-1} com eritrócitos de coelho; as frações proteicas foram também submetidas a ensaios de AH, dosagem de proteínas e eletroforese SDS-PAGE. Em eletroforese a 12 %, as amostras não tiveram seu perfil de bandejamento definido. A fração proteica obtida por fracionamento na saturação de 0-30%, denominada F1Hi, exibiu elevada AH e alto teor protéico; por isso, foi avaliada quanto ao perfil cromatográfico; em cromatografia em suporte de quitina, F1Hi apresentou pico adsorvido e eluído com ácido acético 1 M, o qual apresentou AH, sugerindo a presença de lectinas com potencial interação com a quitina por especificidade para N-acetilglicosamina. F1Hi foi avaliada quanto ao potencial pró-inflamatório; em ensaio de edema de pata induzido por carragenina, F1Hi apresentou ação pró-inflamatória após a 1ª hora. No ensaio de peritonite para contagem de células totais, os grupos tratados com F1Hi apresentaram ação pró-inflamatória similar à carragenina, após a 1ª e 3ª hora; entretanto, após a 6ª hora houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado com F1Hi e o grupo tratado com carragenina, indicando que F1Hi atua de forma diferente da carragenina sobre a indução da migração leucocitária. A partir de todos os resultados obtidos, é sugerido que F1Hi contém lectinas biologicamente ativas em sua composição e que estas biomoléculas podem estar envolvidas com a ação pró-inflamatória apresentada pela preparação.

Palavras-chave: *Handroanthus*, Inflamação, lectinas, atividade biológica, extração proteica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ligação da lectina com carboidratos.....	19
Figura 2 - Rede de hemaglutinação de eritrócitos formada por lectinas.....	20
Figura 3 - Figura 3: Espécies do gênero <i>Handroanthus</i> (sin. <i>Tabebuia</i>). <i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. Ex DC. Mattos (A); <i>Handroanthus caraiba</i> (Mart.) Mattos (B).....	23
Figura 4 - Análise Cromatográfica de F1Hi utilizando suporte de quitina.....	35
Figura 5 - Evolução do edema de pata induzido por carragenina sob o tratamento de F1Hi.....	36
Figura 6 - Efeito do tratamento de ratos com a fração F1Hi (obtida a partir de sementes de <i>H. impetiginosus</i>) nas concentrações de 30mg/Kg ou 100mg/Kg, em inflamação induzida por carragenina. *Diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle.....	37
Figura 7 - Contagem total de células no ensaio de peritonite em ratos tratados com carragenina (C) ou com a fração F1Hi (30mg/Kg) obtida a partir de sementes de <i>H. impetiginosus</i> (T), após 1 hora (C1 e T1), 3 horas (C2 e T2) e 6 horas (C3 e T3).....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade hemaglutinante de extratos de sementes de <i>H. caraiba</i> e <i>H. impetiginosus</i> obtidos com diferentes soluções.....	31
Tabela 2: Concentração proteica, atividade hemaglutinante e atividade hemaglutinante específica de amostras proteicas não dialisadas de sementes de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	32
Tabela 3: Concentração proteica, atividade hemaglutinante e atividade hemaglutinante específica de amostras proteicas dialisadas de sementes de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	33

LISTA DE SIGLAS

AA	Ácido acético
Abs	Absorbância
AH	Atividade hemaglutinante
AHE	Atividade hemaglutinante específica
ABO	Tipo sanguíneo sistema ABO
C	Carragenina
CO	Eritrócitos de Coelho
C1	Grupo controle após a 1ª hora
C2	Grupo controle após a 3ª hora
C3	Grupo controle após a 6ª hora
DF1Hi	Fração proteica dialisada de saturação 0-30% de sulfato de amônio
DF2Hi	Fração proteica dialisada de saturação 30-60% de sulfato de amônio
DF3Hi	Fração proteica dialisada de saturação 60-90% de sulfato de amônio
DF4Hi	Fração proteica dialisada de saturação 0-80% de sulfato de amônio
DS2Hi	Sobrenadante dialisado da fração proteica de saturação 0-30% de sulfato de amônio
DS3Hi	Sobrenadante dialisado da fração proteica de saturação 30-60% de sulfato de amônio
DS3Hi	Sobrenadante dialisado da fração proteica de saturação 60-90% de sulfato de amônio
EB	Extrato bruto
F1Hi	Fração proteica de saturação 0-30% de sulfato de amônio
F2Hi	Fração proteica de saturação 30-60% de sulfato de amônio
F3Hi	Fração proteica de saturação 60-90% de sulfato de amônio
i.p.	Via intraperitoneal
ipl.	Via intrapatalar
IAH	Inibição da atividade hemaglutinante
mg/mL	Miligrama/mililitro
PI	Pico eluido com NaCl 1M
PII	Pico adsorvido com ácido acético
PNA	Pico não adsorvido

S1Hi	Sobrenadante da fração proteica de saturação 0-30% de sulfato de amônio
S2Hi	Sobrenadante da fração proteica de saturação 30-60% de sulfato de amônio
S3Hi	Sobrenadante da fração proteica de saturação 60-90% de sulfato de amônio
T1	Grupo controle após a 1ª hora
T2	Grupo controle após a 3ª hora
T3	Grupo controle após a 6ª hora
p/v	Peso/volume
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1 LECTINAS.....	18
2.1.1 Histórico.....	18
2.1.2 Definição.....	19
2.1.3 Detecção e Especificidade.....	20
2.1.4 Distribuição e Classificação.....	21
2.1.5 Purificação.....	21
2.1.6 Aplicações Biotecnológicas.....	22
2.2 PLANTAS DO GÊNERO <i>Handroanthus</i> (sin. <i>tabebuia</i>).....	23
2.2.1 <i>Handroanthus impetiginosus</i>	24
2.2.2 <i>Handroanthus caraíba</i>	24
2.3 INFLAMAÇÃO.....	25
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 GERAL.....	26
3.2 ESPECÍFICOS.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E PURIFICAÇÃO PARCIAL.....	27
4.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE.....	27
4.3 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA AH.....	28
4.4 ESTIMATIVA DE PROTEÍNAS.....	28
4.5 CARACTERIZAÇÃO ATRAVÉS DE PAGE.....	28
4.6 POTENCIAL PURIFICAÇÃO POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	29
4.7 MODELO DE EDEMA DE PATA EM RATOS, INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	29
4.8 ENSAIO DE PERITONITE E AVALIAÇÃO DE MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA.....	29
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 DETECÇÃO DA ATIVIDADE LECTÍNICA EM SEMENTES DE <i>H. caraíba</i> E <i>H. impetiginosus</i>	31

5.2 EXTRAÇÃO PROTEICA, PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE <i>H. impetiginosus</i>	31
5.3 TESTES <i>in vivo</i>	35
5.3.1 Edema de pata induzido por carragenina.....	35
5.3.2 Ensaio de peritonite e avaliação de migração leucocitária.....	36
6 CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

O emprego das plantas medicinais, envolve tanto as formas mais simples de tratamento local, quanto as formas tecnológicas sofisticadas usadas pela indústria farmacêutica (LORENZI e MATOS, 2008), como os fitoterápicos, remédios a base de plantas (BARNES et al., 2005). O potencial terapêutico desses vegetais pode ser decorrente de estímulos do ambiente, sejam eles físicos, químicos ou biológicos, que podem influenciar na composição química desses vegetais. Tais fatores podem ser a fertilidade do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura e poluição, além de interações com outras plantas, animais e micro-organismos (ALVES, 2001).

Na composição química das plantas, estão os metabólitos primários essenciais como celulose, lignina, proteínas, lipídeos, carboidratos. Ocorrem também os metabólitos secundários, que auxiliam em funções como a defesa das plantas (ALVES, 2001).

Do ponto de vista molecular, o potencial terapêutico das plantas está relacionado à presença de constituintes resultantes do metabolismo secundário, como flavonóides, glicosídeos e alcalóides, e resultantes do metabolismo primário, como enzimas (FITCHES et al., 2004), inibidores de tripsina (LALITHA et al., 2005) e lectinas, os quais conferem resistência e defesa às plantas contra microrganismos, insetos e animais herbívoros, assim como são fonte proteica de reserva de nitrogênio (WANG et al., 2001).

As lectinas são definidas como proteínas de origem não imunológica que ligam a carboidratos livres ou conjugados a superfícies celulares, através de sítios de ligação nos quais o caráter hidrofóbico é a principal força de interação (KENNEDY et al., 1995). Estão amplamente distribuídas na natureza, sendo principalmente isoladas de plantas. São importantes na área biológica, médica e biotecnológica por suas propriedades estruturais e também farmacológicas, atuando como mitogênicas, antiinflamatórias, tóxicas, cicatrizantes, aglutinantes, antimicrobianas, imunomoduladoras, entre outras ações (LI et al., 2008; SILVA et al., 2009; PAUL et al., 2009; SILVA et al., 2011).

Lectinas de origem vegetal têm demonstrado a capacidade de ativar células do sistema imune de mamíferos, principalmente as que possuem especificidade para monossacarídeos (BENTO et al., 1993; BENJAMIN et al., 1997; ALENCAR et al., 2003; PEREIRA, 2013). Vários organismos possuem lectinas que induzem a migração de neutrófilos e células monoclonais *in vivo* em modelos de inflamação em camundongos e ratos (OLIVEIRA et al., 1994; FREIRE et al., 2003). Nesse sentido, pesquisas que investiguem essas interações, que

desencadeiam múltiplos efeitos biológicos, são de grande relevância. Além disso, o estudo da espécie *Handroanthus impetiginosus* como agente pró-inflamatório poderá ser útil para uma maior compreensão da interação lectina e resposta inflamatória, pelo fato de existir interações via estruturas glicanas envolvendo o processo de reconhecimento.

O gênero *Handroanthus* (sin. *Tabebuia*) possui variedades de espécies, as quais são encontradas em todas as regiões do Brasil. Já foram relatados vários estudos sobre suas propriedades biológicas e medicinais, como antiinflamatórias, antiulcerogênicas, inibidoras de infecções, antifúngicas, diuréticas, adstringentes, úteis no tratamento de impetigo e contra alguns tipos de câncer, lúpus, doença de Parkinson, psoríase e alergias (FERREIRA JÚNIOR et al., 2001; LORENZI e MATOS, 2008; TWARDOWSCHY, et al., 2008; SUO et al., 2012); todas essas propriedades podem envolver reconhecimento de superfícies celulares e, por isso, podem ser indicativas de presença de lectinas nesses vegetais.

A descoberta de novas lectinas como ferramentas biotecnológicas aplicáveis no âmbito imunológico, bioquímico e farmacêutico é de grande importância para o desenvolvimento do conhecimento científico e desenvolvimento de novos produtos. Assim, é relevante detectar atividade lectínica em preparações obtidas de *Handroanthus impetiginosus* e *Handroanthus caraiba*, bem como atividade pró-inflamatória de amostras proteicas de *Handroanthus impetiginosus*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 LECTINAS

2.1.1 Histórico

O primeiro estudo sobre lectinas foi feito em 1888 por Hermann Stillmark, utilizando um extrato bruto de sementes de *Ricinus communis* (mamona). Esse extrato apresentou aglutinação com diferentes tipos de eritrócitos; a proteína responsável por esse fenômeno foi denominada ricina (GABOR et al., 2001). Pouco tempo depois em 1891, outra aglutinina foi descoberta por Hellin, a partir de extratos tóxicos de sementes de *Abrus precatorius* (jequeriti), sendo denominada abrina (KENNEDY et al., 1995).

Desde o ano de 1936 relatos foram registrados com a lectina ConA de *Canavalia ensiformis* (L.) DC., de que a aglutinação desenvolvida por essas moléculas poderia ser inibida por carboidratos específicos (ZATTA; CAMMINGS, 1992). A interação proteína-carboidrato foi descrita em 1952, por Watkins e Morgan (VAN DAMME et al., 1998). As primeiras denominações para essas proteínas foram aglutininas, hemaglutininas, fitohemaglutininas ou fitoaglutininas (SHARON; LIS, 1998). Em 1954, Boyd e Shapleigh designaram o termo lectina (original do latim “*lectus*”, que significa escolhido, selecionado) para um grupo de proteínas que apresentam a característica comum de interagir de forma seletiva com carboidratos, comprovando a sua capacidade de aglutinar grupos sanguíneos (MALLER et al., 2002).

As lectinas têm atraído enormemente o interesse de pesquisadores de diversas áreas, como na biologia, medicina e biotecnologia, devido justamente à particularidade em se ligarem especificamente a carboidratos e agirem como mediadores de reconhecimento celular numa variedade de sistemas (TAVARES et al., 1996).

2.1.2 Definição

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem origem não imunológica e apresentam dois ou mais sítios de ligação, com os quais são capazes de interagir reversivelmente com carboidratos ou glicoconjugados (Figura 1) (GOLDSTEIN et al., 1980; SHARON; LIS, 2004). Tais carboidratos podem ser livres ou resíduos de polissacarídeos,

glicoproteínas ou glicolípídeos livres ou conjugados à membranas celulares (MONZO et al., 2007).

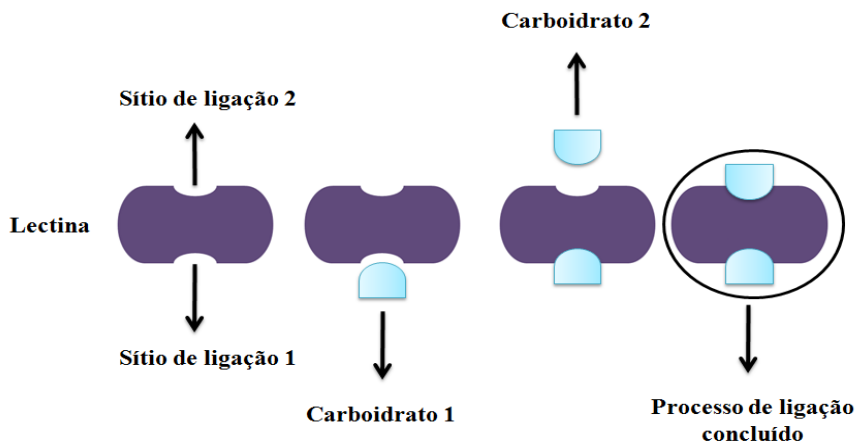


Figura 1 - Ligação da lectina com carboidratos (Fonte o Autor).

Na definição, a ênfase atribuída à origem não imune das lectinas auxilia na distinção de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. Os anticorpos são estruturalmente da mesma natureza, enquanto as lectinas possuem diferenças entre si quanto à composição aminoacídica, requerimento de metais, peso molecular e estrutura tridimensional (MOREIRA et al., 1990).

A partir de análises cristalográficas de raios-X, é possível esclarecer a estrutura de proteínas e seus grupamentos químicos e quais os tipos de ligações que as formam (TAVARES et al., 1996). Como descrito por Kennedy et al. (1995), os sítios ativos de ligação carboidratos presentes na lectina interagem com o carboidrato específico pelo mecanismo de chave-fechadura; Schwarz et al.(1993) e Drickamer et al. (1998) complementaram que essas interações acontecem através de pontes de hidrogênio, coordenações metálicas, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas (YOSHIZUMI et al.,1999).

2.1.3 Detecção e Especificidade

As lectinas podem se apresentar em solução ou ligadas à membrana celular (FLEMMING et al., 1992). Numa amostra, a presença de lectinas pode ser facilmente detectada a partir de ensaios de aglutinação, nos quais essas proteínas interagem com as células, a partir dos seus sítios de ligação, formando ligações reversíveis entre células opostas (Figura 2).

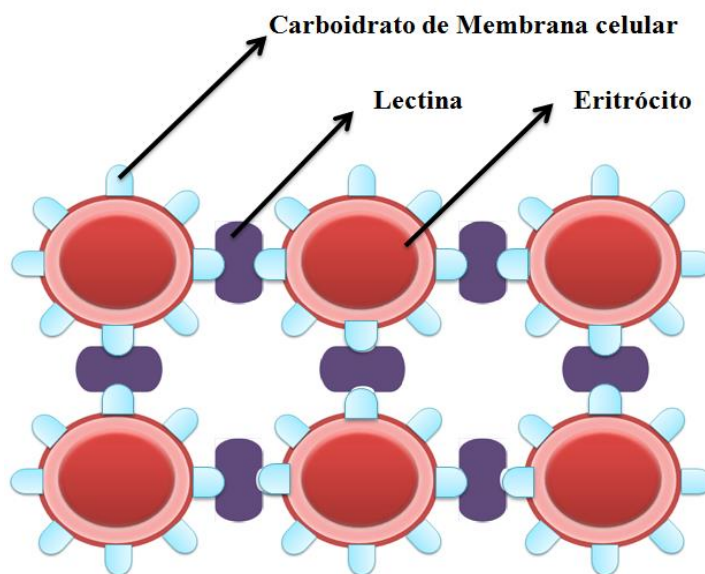


Figura 2 - Rede de hemaglutinação de eritrócitos formada por lectinas (Fonte: O Autor).

Para a detecção da atividade lectínica, o ensaio de hemaglutinação é o mais comumente utilizado, pois permite uma visualização dessa propriedade de aglutinação de eritrócitos por lectinas (SILVA, 2004). As células utilizadas nesse ensaio podem ser de origem humana ou de outros animais, como ratos e coelhos; podem ser células frescas (SAMPAIO et al., 1998; MO et al., 2000) ou tratadas quimicamente ou enzimaticamente (KABIR, 1998; NOMURA et al., 1998; COELHO e SILVA, et al., 2000; DINH et al., 2009). A presença de um ou mais carboidratos específicos, em concentrações determinadas, podem se ligar a lectina e impedir a aglutinação de células (RATANAPO et al., 1998), um fenômeno chamado de inibição, no qual pode-se confirmar que a atividade de hemaglutinação é devido à presença de lectinas (SILVA, 2004).

A especificidade das lectinas é determinada pela conformação exata dos sítios de ligação e da natureza dos resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação ao carboidrato. Dessa forma, pequenas alterações na estrutura dos sítios de ligação, como por exemplo, a substituição de apenas um ou dois resíduos de aminoácidos, podem resultar em alterações significativas na especificidade da lectina, no entanto, sem afetar a estrutura tridimensional da proteína (SHARON; LIS, 1998).

2.1.4 Distribuição e Classificação

Já foram relatadas lectinas presentes em uma ampla variedade de organismos, como plantas, vírus, bactérias, fungos, invertebrados, insetos e organismos simbióticos como liquens (KENNEDY et al., 1995; VIJAYAN; CHANDRA, 1999; SILVA, 2004;). Nas plantas, as lectinas têm sido encontradas em diferentes famílias e diferentes tecidos de uma mesma espécie (CHRISPEEL; RAIKHEL, 1991). O grupo das lectinas é bastante heterogêneo, apresentando diferenciações na especificidade, estrutura molecular e atividade biológica (ELGAVISH et al., 1997).

A classificação pode ser feita de acordo com a especificidade de interação ao carboidrato, pertencendo ao grupo glicose/manose específicas (CORREIA; COELHO, 1995; NOMURA et al., 1998; PIMENTEL, 2009), grupo fucose, grupo galactose/N-acetilgalactosamina, grupo ácido siálico ou grupo glicanos complexos (PIMENTEL, 2009).

Na maioria das lectinas de leguminosas, há a necessidade de íons metálicos carregados positivamente (Ca^{+2} , Mn^{+2} ou outro metal de transição) para ajudar a manter a estrutura terciária em uma conformação favorável para a ligação ao carboidrato (LIENER, 1980; VAN DAMME et al., 1998; AUDETTE et al., 2000).

As lectinas também podem ser classificadas de acordo com sua estrutura molecular; merolectinas, que apresentam um único sítio ligante para carboidratos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; DRICKAMER, 1998), são formadas por um único polipeptídeo e incapazes de aglutinar células (SILVA, 2004). E ainda, de acordo com Peumans e Van Damme (1995) as hololectinas, as quais apresentam apenas domínio de ligação para carboidrato, entretanto possuem dois ou mais sítios de ligação, compreendendo a maior parte das lectinas de plantas; quimerolectinas, as quais possuem domínio ligante a carboidrato e um outro domínio com atividade biológica não relacionada; superlectinas, que possuem dois ou mais domínios de ligação estruturalmente diferentes, que reconhecem carboidratos distintos.

2.1.5 Purificação

Para se estudar uma proteína em detalhes é necessário separá-la de outras proteínas em sua forma pura, sendo necessária a utilização de métodos clássicos e modernos explorando

as características variadas das proteínas como tamanho, carga e propriedades de ligação (NELSON; COX, 2013).

No processo de purificação de lectinas, em especial as de origem vegetal, é feita a extração proteica em solução salina (KAWAGISHI et al., 2001) ou solução tampão (TRIGUEIROS et al., 2003). O material vegetal é adicionado à solução em concentrações e tempo determinado, sob agitação constante (SILVA, 2004). Posteriormente, é realizada a purificação parcial a partir dos extratos com atividade lectínica pelo procedimento de fracionamento salino seguido de diálise exaustiva (KENNEDY et al., 1995), onde as propriedades físico-químicas das proteínas são de fundamental importância (PIMENTEL, 2009).

Outro método utilizado para o isolamento de proteínas é a cromatografia; o qual explora as propriedades moleculares da proteína e podem ser de tipos variados, como de exclusão molecular, de troca iônica e de afinidade (PESSOA JR. e KILIKIAN, 2005). Existem protocolos que combinam diferentes métodos cromatográficos para a purificação total da proteína (WANG; NG, 2003).

2.1.6 Aplicações Biotecnológicas

Por apresentarem propriedades características, as lectinas são de grande importância na área da bioquímica, da biologia celular, da medicina e da imunologia (SILVA, 2004). Essas moléculas desempenham diversos efeitos sobre a célula como aglutinação (SILVA, 2004), induzir respostas pró ou anti-inflamatórias (QUEIROZ, 2008; BEZERRA, 2012), efeito antinociceptivo por via oral (VIANA et al., 2002; NEVES et al., 2007). Também foram relatados estudos usando lectinas na diferenciação de tumores malignos e benignos e na definição do grau de glicosilação associado à metáfase (LIU et al., 2010), na histoquímica para avaliação da superfície celular de tecidos (BANDEIRA et al., 2011) e no diagnóstico de patologias cerebrais, como mudanças degenerativas convencionais (CARVALHO, et al., 2011).

Essas são apenas algumas das aplicações relatadas para as lectinas, sendo de grande importância investir no estudo quanto à purificação e aplicações de novas lectinas. Em especial, plantas utilizadas pela medicina popular com variadas aplicações farmacológicas, como as do gênero *Handroanthus*, as quais a partir da detecção dessas proteínas elas poderiam ser isoladas e posteriormente associar o potencial da farmacológico da planta à

proteína. Com o auxílio da biotecnologia essas proteínas (bioprodutos) futuramente poderiam ser aplicada no mercado farmacológico.

2.2 PLANTAS DO GÊNERO *Handroanthus* (sin. *Tabebuia*)

A grande variedade de espécies do gênero *Tabebuia* apresentam flores amarelas e com variações de roxo; são todas angiospermas da família Bignoneaceae, e foram classificadas como pertencentes do gênero *Handroanthus*. Este gênero é composto por árvores decíduas de grande porte que apresentam ocorrência em todas as regiões do Brasil (LORENZI, 2008).

As espécies do gênero *Handroanthus* são, *H. chrysotrichus* (Mart. Ex A. DC.) Mattos, *H. ochraceus* (Cham.) Mattos, *H. umbellatus* (Sond.) Mattos, *H. vellosi* (Toledo) Mattos, *H. heptaphyllus* (Vell.) Mattos, *H. roseo-albus* (Ridl.) Mattos, *H. serratifolius* (Vahl) S.O. Grose, *H. impetiginosus* (Mart. Ex DC. Mattos, *Handroanthus caraiba* (Mart.) Mattos, sendo as duas últimas (Figura 3) bastante encontradas no Nordeste do Brasil. Todas elas são conhecidas como “ipê”, tendo variações apenas nas terminações da sua denominação (LORENZI, 2008).

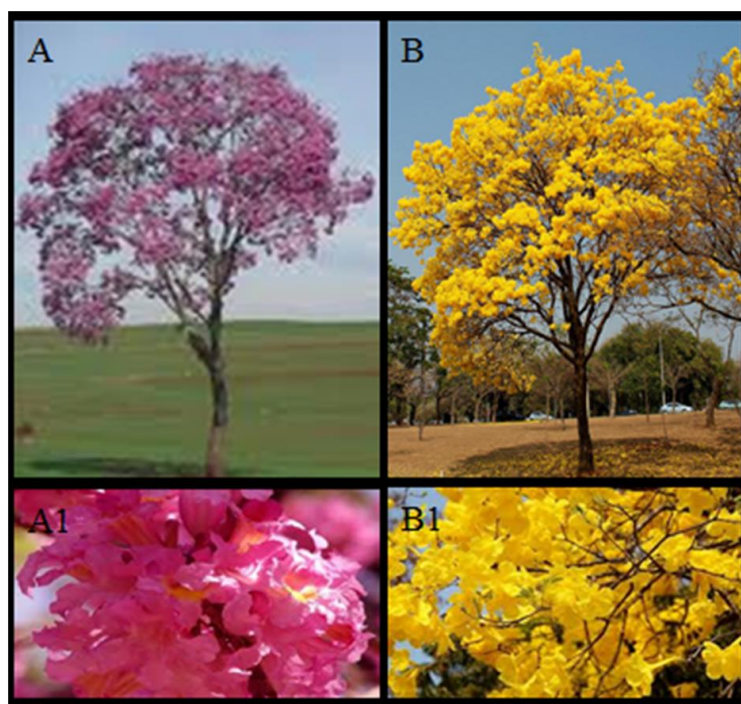


Figura 3 - Espécies do gênero *Handroanthus* (sin. *Tabebuia*). *Handroanthus impetiginosus* (Mart.) Ex DC. Mattos (A) e sua inflorescência (A1); *Handroanthus caraiba* (Mart.) Mattos (B) e sua inflorescência (B1). (Fonte: <http://florademisiones.blogspot.com.br/2010/02/androanthus-heptaphyllus.html>; <http://plantearvore.org.br/photo/ipe-roxo-do-grande>; <http://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/8018336483>).

De acordo com Lorenzi e Matos (2008) na literatura etnobotânica, as cascas de *Handroanthus impetiginous* são usadas pela medicina popular na forma de chá como anti-infeccioso, antifúngico, diurético, adstringente, no tratamento de impetigo e contra alguns tipos de câncer, lúpus, doença de Parkinson, psoríase e alergias. *H. avellanadae* tem sido relatada por possuir atividade anti-inflamatória (SUO et al., 2012; FERREIRA JÚNIOR et al., 2001) e antiulcerogênica (TWARDOWSCHY, et al., 2008).

2.2.1 *Handroanthus impetiginosus*

A espécie *Handroanthus impetiginosus* (*Tabebuia impetiginosa*) conhecida popularmente com Ipé roxo é uma árvore encontrada com frequência em florestas tropicais no Nordeste, Sudeste e Centro-oeste brasileiros, na Caatinga, Mata Atlântica e Cerrado (LORENZI, 2008). O "Taheebo", designação para a sua casca roxa, tem sido tradicionalmente usado para várias aplicações etnofarmacológicas. Há mais de 1.000 anos a casca interna tem sido utilizada como um dos primeiros medicamentos pela tribo Callawaya, e seu chá é muito utilizado para o tratamento de uma variedade de doenças inflamatórias de pele como eczema, psoríase, infecções fúngicas e para diminuição dos sintomas do câncer de pele (DE SANTANA et al., 1968; HASHIMOTO, 1996; WOO, et al., 2005). Segundo Lorenzi e Matos (2008), as cascas de *H. impetiginosus* são usadas pela medicina popular na forma de chá, com propriedade anti-infecciosa, antifúngica, diurética, adstringente, no tratamento de impetigo, contra alguns tipos de câncer, lúpus, doença de Parkinson, psoríase e alergias.

Em análises fitoquímicas, furano naftoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas, derivados do ácido benzóico, derivados de benzaldeído, iridóides, cumarinas e flavonóides foram isolados e identificados (KIM et al., 2007; UEDA et al., 2013). Glicosídeos fenilpropanóides foram também isolados do extrato em água fervente e apresentaram atividade antioxidante (LÓPEZ-MUNGUÍA et al., 2011; BOOKE et al., 2012; ABDEL-MAGEED et al., 2012; SUO et al., 2013).

2.2.2 *Handroanthus caraiba*

De acordo com o Centro Nordestino de Informações sobre Plantas da Associação Plantas do Nordeste a *H. Caraiba* (*Tabebuia caraiba*) é comumente conhecida como “craibeira” ou “caraíba”. Seu nome é de origem indígena (carayba-lenho, forte e duro). Também classificada

como *Tabebuia caraiba*, é característica da vegetação da Caatinga e do cerrado em altitudes ao nível do mar até 1500 m; nos tabuleiros do litoral e da chapada do Araripe; e encontrada principalmente nas florestas ciliares em solos aluvionais da zona seca de Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará, especialmente nos terrenos arenosos profundos do baixo Seridó apesar de ocorrer também nas margens pedregosas dos rios dessa região no RN (CniP PNI, 2014).

De acordo com a medicina popular, suas raízes são usadas contra gripe, resfriados e tosses, como chá, por decocção ou infusão; as cascas apresentam propriedades febrífugas e depurativas (MARONI et al., 2006).

2.3 INFLAMAÇÃO

A inflamação é um processo complexo, produzido por alterações tissulares mediante uma lesão causada, por exemplo, por agente infeccioso, substâncias químicas, calor ou traumatismos (BATISTA et al., 2012). Esse processo pode ser desenvolvido por diversos agentes, dentre eles, físicos, químicos ou biológicos, que vão ocasionar alterações na membrana celular desencadeando a ativação da fosfolipase A2, assim como também a liberação de ácido araquidônico, PAF-acéter e enzimas lisossômicas (POTT JUNIOR e LOPES, 2014).

Durante o processo inflamatório os tecidos atingidos liberam diversas substâncias desencadeando respostas secundárias, sendo as principais, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento, migração e ativação de leucócitos; estes últimos são responsáveis pela produção de citocinas e de espécies reativas de oxigênio (ROS) bem como pela realização de fagocitose no tecido. Essa resposta tem como objetivo inicial eliminar, neutralizar ou isolar o agente responsável pela inflamação, promovendo a restauração dos tecidos atingidos pela lesão e pelo processo inflamatório em si (ABBAS et al., 2005).

A inflamação pode ser categorizada em aguda, crônica ou transitória. Nesta não há dano tecidual ocasionado pelos nociceptores (LOESER e MELZACK, 1999); na inflamação aguda ocorre um aumento de permeabilidade vascular, juntamente com dilatação, agrupamento de leucócitos e dor (POTT JUNIOR e LOPES, 2014); na categoria crônica o processo pode durar até meses, em que a destruição tecidual e reparo do mesmo ocorrem simultaneamente de corrente da presença de macrófagos e linfócitos, assim como a ocorrências de proliferação celular, fibrose e necrose tecidual (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar atividade lectínica em amostras obtidas de diferentes tecidos vegetais de *Handroanthus impetiginosus* e *Handroanthus caraíba*, bem como avaliar a atividade pró-inflamatória de amostras proteicas de *Handroanthus impetiginosus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Extrair proteínas de sementes de *Handroanthus caraíba* e *Handroanthus impetiginosus*;
- Detectar a presença de atividade lectínica em extratos;
- Caracterizar as amostras com atividade lectínica quanto a especificidade e perfil proteico;
- Purificar parcialmente as amostras lectínicas de *H.impetiginosus*;
- Potencialmente, purificar lectina(s) de *H.impetiginosus*;
- Avaliar efeito *in vivo* de amostras proteicas sobre edema de pata induzido por carragenina;
- Avaliar a migração leucocitária induzida por amostras proteicas.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E PURIFICAÇÃO PARCIAL

Especimes de *Handroanthus caraiba* (Mart.) e *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC.) Mattos foram coletadas e comparadas com as coleções do acervo do Herbário Dárdano e Andrade-Lima, do Departamento de Ciências Vegetais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, com o números de registro MOSS7118 e MOSS3007, respectivamente. As sementes foram coletadas, selecionadas, limpas, secas em temperatura ambiente e trituradas.

As farinhas foram submetidas à extrações em solução salina (NaCl 0,15 M) e em soluções tamponantes a 10% (p/v). Foram utilizados tampão fosfato de sódio e tampão citrato fosfato, ambos em NaCl a 100mM, (pH 6,0; 7,0; 8,0 e pH 6,2; 7,5; 8,2, para *H. caraiba* e *H. impetiginosus*, respectivamente); seguidas de filtração em gaze e centrifugação refrigerada (8000 rpm, 20 min).

O extrato bruto de *H. impetiginosus* em NaCl (EB), obtido após centrifugação foi submetido a fracionamentos salinos utilizando sulfato de amônio para precipitação proteica. As concentrações salinas do EB foram estabelecidas inicialmente para 30% (p/v), submetida a agitação constante durante 4h em temperatura ambiente seguidos de centrifugação (8000 rpm, 20 min) e diálise exaustiva em membranas semipermeáveis (a 4°C, contra água destilada por 2h, em seguida contra NaCl 0,15 M por 3h, com duas trocas). A metodologia foi repetida utilizando o sobrenadante oriundo da centrifugação para as concentrações de 30-60% e em seguida 60-90%. Para *H. impetiginosus* o EB também foi fracionada à concentração salina de 80% (p/v). As frações proteicas precipitadas foram ressuspensas em NaCl 0,15M (denominadas F1Hi, F2Hi, F3Hi e F4Hi, respectivamente às saturações).

4.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE (AH)

Para detecção de atividade lectínica, as amostras proteicas foram submetidas a ensaios de atividade hemaglutinante (AH) em placas de microtitulação (CORREIA e COELHO, 1995). Foram feitas diluições seriais das amostras em NaCl 0,15 M, seguidas da adição de eritrócitos em suspensão de 2,5 %, tratados com glutaraldeído; o título da AH foi determinado

como o inverso da maior diluição com total aglutinação, após 45 min de repouso. AH específica foi determinada como a AH dividida pela concentração proteica (mg/mL). Foram utilizados eritrócitos humanos ou eritrócitos de coelho, tratados com glutaraldeído baseado na metodologia de Bing e colaboradores (1967).

4.3 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA AH

Para determinação de especificidade lectínica, em placas de microtitulação foram feitas diluições seriadas das amostras em soluções contendo carboidratos utilizando os carboidratos glicose, frutose e galactose (concentrações entre 1,56 e 200 mM, em NaCl 0,15 M). Após repouso (15 min), foram adicionados eritrócitos (humanos ou de coelho) em suspensão de 2,5 % (v/v), glutarizados. O título foi determinado após repouso (45 min). A leitura da inibição da AH foi determinada como o inverso da maior diluição com aglutinação total, comparada a AH e estabelecida se houve inibição total, parcial ou ausência de inibição.

4.4 ESTIMATIVA DE PROTEÍNAS

A quantificação de proteínas nas amostras contendo lectinas foi procedida segundo Lowry et al. (1951), sendo utilizada uma curva padrão de albumina sérica bovina, com valores compreendidos entre 31,25 e 500 µg. As amostras de EB, frações precipitadas e sobrenadantes finais, obtidas pré e pós-diálise, foram submetidas à quantificação de proteínas.

4.5 CARACTERIZAÇÃO ATRAVÉS DE PAGE

Foram realizadas técnicas eletroforéticas em géis de poliacrilamida (PAGE, 12%), contendo sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE) para proteínas desnaturadas e ou reduzidos (LAEMMLI, 1970). Em SDS-PAGE, as amostras liofilizadas foram aplicadas, tratadas ou não com β-mercaptoetanol. As corridas eletroforéticas foram realizadas com corrente constante, em temperatura ambiente. As bandas proteicas foram detectadas com a utilização do corante azul de Coomassie. A descoloração foi realizada com lavagens sucessivas em ácido acético a 10 % (v/v).

4.6 POTENCIAL PURIFICAÇÃO POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Foram realizadas cromatografias com as amostras parcialmente purificadas, da Fração 0-30% de *H. impetiginosus* contendo a presença de atividade lectínica; utilizaram-se matrizes de afinidade de Guaran em polímero de galactose e Quitina em polímero de N-acetilglicosamina. As colunas foram estabilizadas (utilizando-se um fluxo de 20mL/h) com NaCl 0,15M e eluídas com NaCl 1M. Na coluna de Quitina também foi utilizado ácido acético 1M para a eluição final. As amostras foram aplicadas a uma concentração proteica definida, num sistema sob fluxo contínuo definido; foram recolhidas frações não adsorvidas e adsorvidas, de volume determinado. Todas as frações foram monitoradas por absorbância UV 280 nm e AH. Para as frações eluídas com NaCl 1M ou com ácido acético foi realizada diálise exaustiva em membranas semipermeáveis, a 4 °C, por 5 horas com 3 trocas.

4.7 MODELO DE EDEMA DE PATA EM RATOS, INDUZIDO POR CARRAGENINA

Foram utilizados ratos (linhagem “wistar”, fêmeas adultas) de acordo com a metodologia de Bezerra (2012), distribuídos em três grupos de seis animais (um grupo controle tratado com solução salina aplicada intraperitonealmente (i.p.); dois grupos tratados com F1Hi aplicada i.p. nas concentrações de 30 ou 100 (mg/Kg), obtidos no biotério da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Carragenina (100µg/pata em 100µL de água destilada) foi aplicada intraplantarmente (ipl.) na pata ipsolateral (direita). O volume da pata foi medido no tempo zero, na 1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 15^a hora após a aplicação da carragenina, utilizando um pletismômetro artesanal. O edema foi calculado por variação de volume da pata, para análise da indução ou inibição da inflamação. Após a 16^a hora os animais foram anestesiados e sacrificados.

4.8 ENSAIO DE PERITONITE E AVALIAÇÃO DE MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

Foram utilizados ratos (linhagem “wistar”, fêmeas adultas) distribuídos em seis grupos de cinco animais (três grupos controle tratados com carragenina; três grupos tratados com F1Hi na concentração de 30mg/Kg), obtidos no biotério da Universidade Estadual do RN. Carragenina (300µg em 1 ml de solução salina) foi aplicada i.p. nos animais dos grupos

controles (C1, C2 e C3); F1Hi (30µg/ml) foi aplicada i.p. nos animais dos grupos tratados (T1, T2 e T3). Após a 1ª, 3ª e 6ª hora, os animais de um grupo controle e um grupo tratado com F1Hi foram sacrificados por deslocamento cervical; em seguida foram injetados 10 ml de salina estéril na cavidade peritoneal e o fluido foi coletado. 20µL do fluido peritoneal foi adicionado a 380µL de solução de Turk (uma proporção de 1:20); 10µL do fluido diluído foram aplicados em câmara de Neubauer para a contagem do número de células totais nos 4 quadrantes principais da câmara (cada quadrante tem 0,1 mm³), obtendo-se o número de células por mm³.

4. 9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram submetidos à análise pelo programa estatístico GraphPad Prisma, utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de um pós-teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes, tanto para o ensaio de edema de pata em ratos quanto para o ensaio de migração leucocitária.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETECÇÃO DA ATIVIDADE LECTÍNICA EM SEMENTES DE *H. caraiba* E *H. impetiginosus*

Nos processos de extração utilizando sementes de *H. caraiba* e *H. impetiginosus* em solução salina e solução tamponante em diferentes pHs, os melhores resultados de AH foram obtidos quando utilizada solução tamponante em citrato fosfato, pH 6,0 e solução salina NaCl 0,15M, para *H. caraiba* (título de 16^{-1}) e *H. impetiginosus* (título de 1024^{-1}), respectivamente (Tabela 1). NaCl 0,15M é uma solução utilizada em vários processos de extração diante da manutenção, nessa solução, da atividade biológica de proteínas de interesse (COELHO; SILVA, 2000).

Tabela 1: Atividade hemaglutinante de extratos de sementes de *H. caraiba* e *H. impetiginosus* obtidos com diferentes soluções.

Espécie	Extração	pH	Atividade Hemaglutinante ($^{-1}$)				
			A	B	AB	O	CO
<i>H. caraiba</i>	Tampão Citrato fosfato	6.0	8	-	8	8	16
	Tampão Fosfato de sódio (PBS)	7.0	-	-	-	-	-
		8.0	-	-	-	-	-
	Solução salina (NaCl, 0,15 M)	*	-	-	-	-	4
<i>H. impetiginosus</i>	Tampão Citrato fosfato	6.2	-	-	-	-	-
	Tampão Fosfato de sódio (PBS)	7.5	-	-	-	-	8
		8.2	-	-	-	-	-
	Solução salina (NaCl, 0,15 M)	*	-	2	-	-	1024

A; B; AB; O: Eritrócitos glutarizados humanos (sistema ABO); CO: Eritrócitos glutarizados de coelho; * : pH não estabelecido; -: ausência de AH.

A partir dos resultados de AH obtidos, F1Hi foi selecionada para o desenvolvimento dos ensaios subseqüentes.

5.2 EXTRAÇÃO PROTEICA, PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *H. impetiginosus*

O extrato bruto em NaCl, 0,15 M de *H. impetiginosus* foi submetido ao processo de precipitação proteica fracionada, utilizando sulfato de amônio para separar as proteínas de

acordo com a solubilidade das mesmas, que precipitam em diferentes concentrações de sal, de acordo com a perda da camada de solvatação. Os pellets (frações proteicas) foram resuspendidos na solução de extração (NaCl 0,15 M). Frações e sobrenadantes foram submetidos a ensaios de AH; os sobrenadantes apresentaram maior AH em relação ao seu respectivo EB (Tabela 2). As frações e respectivos sobrenadantes após o processo de diálise apresentam uma diminuição da AH, decorrente da diluição da amostra que o processo possa ter ocasionado. Além disso, as frações 1 e 2 de *H. impetiginosus* (F1Hi e F2Hi), mesmo sendo homogeneizadas, apresentaram um precipitado no decorrer do tempo. F1Hi apresentou maior rendimento proteico (7,19 mg/ml) e maior AH (32^{-1} CO), seguida de F2Hi (2,49 e 32^{-1} CO) e F3Hi (0,02 e 8^{-1} CO), em ordem decrescente.

Nos teste de AH utilizando-se eritrócitos humanos para todos os tipos sanguíneos os títulos de AH obtidos foram iguais. A fração 4 de *H. impetiginosus* (F4Hi) e seu sobrenadante foram avaliados somente após diálise; F4Hi mostrou elevada AH (512^{-1}) enquanto seu sobrenadante não apresentou título de AH. A diferença de AH e concentração de proteínas entre as frações pode indicar a presença de mais de uma proteína responsável pela hemaglutinação, já que foram precipitadas em concentrações de sulfato de amônio diferentes.

Tabela 2: Concentração proteica, atividade hemaglutinante e atividade hemaglutinante específica de amostras proteicas não dialisadas de sementes de *Handroanthus impetiginosus*.

Amostra	Eritrócitos	AH($^{-1}$)	Proteína(mg/mL)	AHE ¹ (AH/mg)
EB	ABO	2	8,47	0,94
	CO	8		
F1Hi	ABO	64	9,6	17,80
	CO	128		
S1Hi	ABO	4	*	-
	CO	32		
F2Hi	ABO	64	6,57	9,73
	CO	64		
S2Hi	ABO	32	*	-
	CO	16		
F3Hi	ABO	32	0,62	51,54
	CO	32		
S3Hi	ABO	4	*	-
	CO	4		

ABO: Todos os eritrócitos do sistema (ABO); AH: Atividade Hemaglutinante; AHE¹: Atividade hemaglutinante específica com eritrócitos glutarizados de coelho; *: Valores abaixo

da curva padrão de dosagem. EB: extrato bruto; F1Hi: Fração obtida da precipitação com 0-30 % de sulfato de amônio; F2Hi: Fração obtida da precipitação com 30-60 % de sulfato de amônio; F3Hi: Fração obtida da precipitação com 60-90 % de sulfato de amônio; S1Hi: Sobrenadante resultante da precipitação com 0-30 % de sulfato de amônio; S2Hi: Sobrenadante resultante da precipitação com 30-60 % de sulfato de amônio; S3Hi: sobrenadante resultante da precipitação com 60-90 % de sulfato de amônio.

As amostras mostraram presença de lectínas; suas concentrações proteicas diminuíram devido a diluição proporcionada pelo processo de diálise exaustiva em membrana semipermeável (Tabela 3). A dosagem mostrou que o fracionamento salino promoveu a obtenção de F1Hi, com a maior concentração proteica e título de AH; entretanto maior valor de AH específica (AHE) foi atribuído para F3Hi. Os sobrenadantes referentes a todas as frações não apresentaram valores mínimos de concentração proteica detectáveis pelo método de Lowry (1951).

Tabela 3: Concentração proteica, atividade hemaglutinante (AH) e AH específica (AHE) de amostras proteicas dialisadas de sementes de *Handroanthus impetiginosus*.

Amostra	Eritrócitos	AH(⁻¹)	Proteína(mg/mL)	AHE ¹ (AH/mg)
DF1Hi	ABO	16	7,19	4,44
	CO	32		
DS1Hi	ABO	0	*	-
	CO	16		
DF2Hi	ABO	16	2,49	12,85
	CO	32		
DS2Hi	ABO	0	*	-
	CO	16		
DF3Hi	ABO	4	0,02	400
	CO	8		
DS3Hi	ABO	0	*	-
	CO	4		
DF4Hi	ABO	16	2,8	5,71
	CO	512		

ABO: Todos os eritrócitos do sistema (ABO); AH: Atividade Hemaglutinante; AHE¹: Atividade hemaglutinante específica com eritrócitos glutarizados de coelho; *: Valores abaixo da curva padrão de dosagem. EB: extrato bruto; DF1Hi: Fração obtida da precipitação com 0-30 % de sulfato de amônio; DF2Hi: Fração obtida da precipitação com 30-60 % de sulfato de amônio; DF3Hi: Fração obtida da precipitação com 60-90 % de sulfato de amônio; DF4Hi: Fração obtida da precipitação com 0-80 % de sulfato de amônio, respectivamente DS1Hi:

Sobrenadante resultante da precipitação com 0-30 % de sulfato de amônio; DS2Hi: Sobrenadante resultante da precipitação com 30-60 % de sulfato de amônio; DS3Hi: sobrenadante resultante da precipitação com 60-90 % de sulfato de amônio.

Ensaio de inibição da AH por carboidratos foram realizados com F1Hi, F2Hi e F4Hi (utilizando galactose, frutose e glicose, respectivamente, utilizando eritrócitos glutarizados de coelho ou humanos), para avaliar uma possível interação entre estes e domínios de ligação de lectinas potencialmente presentes nas amostras. Os carboidratos testados em diferentes concentrações (200, 100, 50 e 25mM) não foram inibidores de AH das amostras avaliadas. No entanto, outros carboidratos ou glicoconjugados podem ser testados para determinar a especificidade lectínica dessas preparações. Carboidratos ou glicoconjugados asseguram a natureza da lectina responsável pela hemaglutinação, a qual é inibida a partir da interação específica da proteína a um ou mais carboidratos (KENNEDY et al., 1995).

As frações dialisadas de sementes de *H. impetiginosus* (F1Hi, F2Hi e F3Hi) e seus respectivos sobrenadantes dialisados (S1Hi, S2Hi e S3Hi) (amostras liofilizadas contendo 0,2 e 0,4 mg/ml) foram avaliadas em eletroforese em gel de poliacrilamida (12 %) sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), tratadas ou não com β -mercaptoetanol. SDS-PAGE a 12 % não revelou bandas definidas para essas amostras; entretanto, foi constatada presença de bandas proteicas que não entraram do gel de corrida (ficaram restritas ao gel de concentração) e outras na frente de corrida do gel. A caracterização eletroforética das preparações necessita uma análise mais detalhada, utilizando diferentes concentrações de acrilamida, ou géis para proteínas nativas.

A amostra F1Hi foi selecionada para os ensaios cromatográficos e de inflamação *in vivo* devido ao seu maior teor proteico, maior título de AH e maior disponibilidade/rendimento. Os processos cromatográficos foram realizados a um fluxo de 20mL/h e as frações coletadas foram monitoradas em espectrofotômetro a uma absorbância UV 280nm. Utilizando-se cromatografia em gel de Guar (um polímero de galactose), não foi observada adsorção proteica ao suporte; o pico referente ao não adsorvido teve suas frações coletadas agrupadas e foi submetido a ensaios de AH com eritrócitos humanos do sistema ABO e eritrócitos de coelho, mas não apresentou título de AH. Esse resultado sugere que a atividade lectínica presente na amostra aplicada pode ter sido perdida pela diluição da amostra ou por desnaturação proteica durante o processo cromatográfico. A dosagem proteica do pico não adsorvido revelou uma concentração de 28,22 mg/mL. O resultado do processo

cromatográfico confirmou a não especificidade lectínica da amostra para galactose, determinada pelo ensaio de inibição, comprovando a ineficiência desse suporte cromatográfico para a purificação lectínica a partir de F1Hi.

Um segundo suporte cromatográfico, a quitina (um polímero de N-acetil-glicosamina), foi testado sob as mesmas condições de fluxo e monitoramento. Foram obtidos três picos cromatográficos: o pico não adsorvido (PNA), um segundo pico menos expressivo a partir da eluição com NaCl 1M (PI) e um pico de material adsorvido e eluído com ácido acético 1M (PII) (Figura 4). As frações coletadas referentes aos picos foram agrupadas; o pico eluído com ácido acético 1M foi dialisado e juntamente com os demais foi submetido a ensaios de AH. PNA e PI não apresentaram AH; entretanto PII apresentou AH: 16^{-1} , frente a eritrócitos glumarizados humanos do sistema ABO.

Os picos também foram quantificados quanto a sua concentração proteica, apresentando 0,021 mg/ml (PNA) e 0,057 mg/ml (PII). PI não apresentou valor mínimo de concentração proteica detectável pelo método de Lowry (1951). A AH apresentada por PII mostrou que a quitina (polímero de N-acetil-glicosamina) é um suporte eficiente para a obtenção de amostra lectínica a partir de F1Hi. A adsorção de proteínas com atividade lectínica ao suporte sugere que proteínas presentes em F1Hi podem estar ligando à quitina através de interações iônicas, ou mesmo por bioafinidade a resíduos de N-acetil-glicosamina.

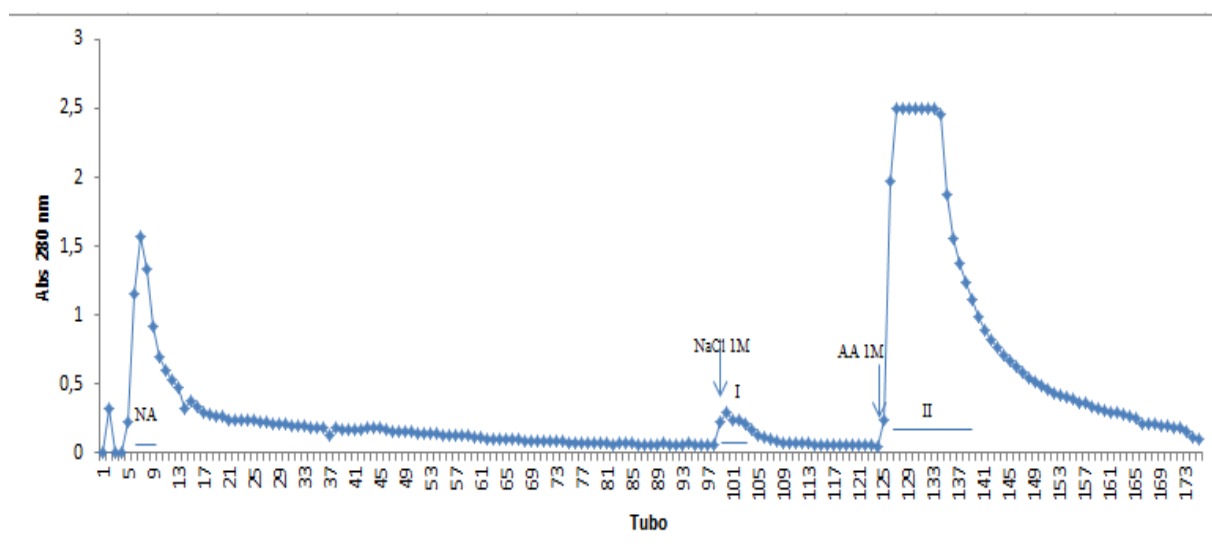


Figura 4: Análise Cromatográfica de F1Hi utilizando suporte de quitina.

5.3 TESTES *in vivo*

5.3.1 Edema de pata induzido por carragenina

No ensaio de edema de pata induzido por carragenina, os resultados obtidos com os grupos tratados após a 2^a, 3^a, 4^a e 15^a hora não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle, quando avaliados por ANOVA ($p < 0.05$). No entanto, grupos tratados com F1Hi nas concentrações de 30mg/kg ou 100mg/kg apresentaram, após a 1^a hora, uma indução de edema dose-dependente (Figura 5), quando os volumes das patas foram comparados aos dos animais do grupo controle, tratados com salina (que apresentaram edema formado por ação da carragenina referente ao crescimento edematoso).

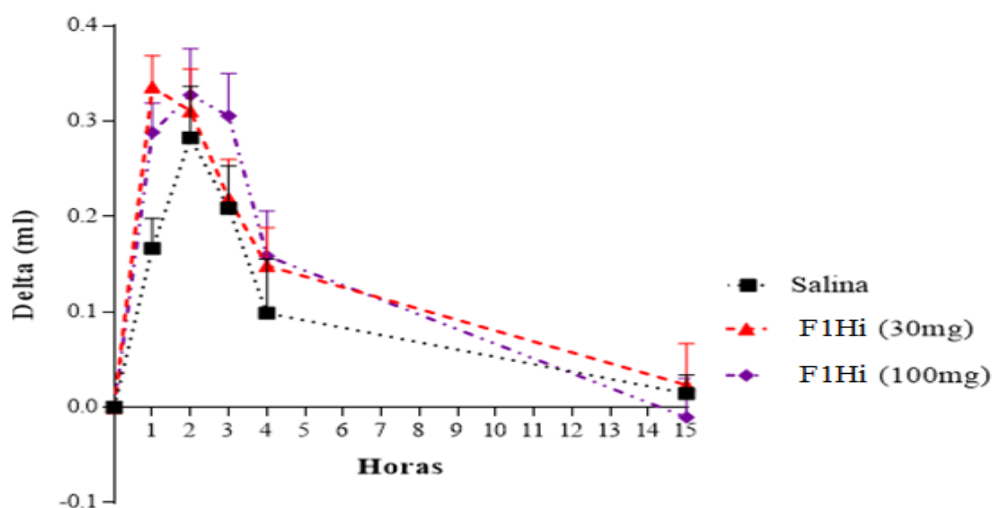


Figura 5 – Evolução do edema de pata induzido por carragenina sob o tratamento de F1Hi.

As induções de edema de 0.1666 ± 0.0780 (grupo controle) para 0.3360 ± 0.0800 (grupo tratado com F1Hi, 30mg/kg) e para 0.2883 ± 0.0752 (grupo tratado com F1Hi, 100mg/kg) corresponderam a 101% e 73%, respectivamente (Figura 6). A fração proteica F1Hi apresentou efeito pró-inflamatório em condições de tempo e dose específicas no teste proposto. Várias proteínas isoladas de vegetais, como lectinas de leguminosas, já revelaram efeito pró-inflamatório a partir da ativação de citocinas indutoras da inflamação (ALENCAR et al., 2005; SARTIM, 2010).

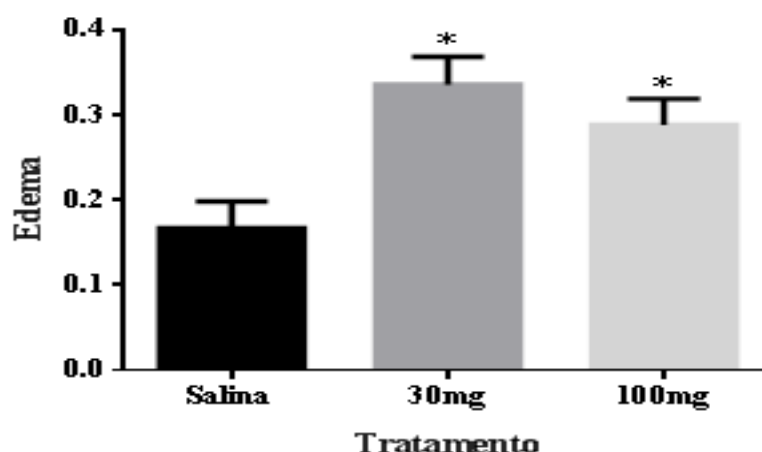


Figura 6. Efeito do tratamento de ratos com a fração F1Hi (obtida a partir de sementes de *H. impetiginosus*) nas concentrações de 30mg/Kg ou 100mg/Kg, em inflamação induzida por carragenina. *Diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle.

5.3.2 Ensaio de peritonite e avaliação de migração leucocitária

O modelo de peritonite induzido por carragenina em ratos foi avaliado utilizando F1Hi na dose de 30mg/kg. Após a 1ª e 3ª hora, F1Hi promoveu migração celular equivalente à carragenina no peritônio de animais, indicada pela ausência de diferença significativa entre os grupos tratados e grupos controle (Figura 6). O resultado confirma a ação pró-inflamatória de F1Hi, observada no ensaio de edema de pata induzido por carragenina.

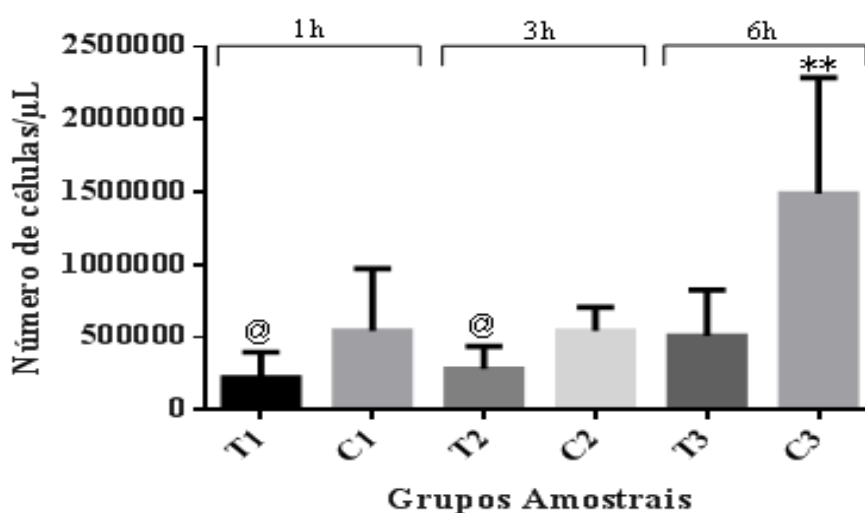


Figura 7. Contagem total de células no ensaio de peritonite em ratos tratados com carragenina (C) ou com a fração F1Hi (30mg/Kg) obtida a partir de sementes de *H. impetiginosus* (T), após 1 hora (C1 e T1), 3 horas (C2 e T2) e 6 horas (C3 e T3); *Diferença significativa em

relação aos demais grupos ($p>0,05$); @: Não apresentou diferença significativa em relação aos controles ($p>0,05$).

A carragenina é caracterizada por eliciar a liberação de vários mediadores inflamatórios, entre esses estão as aminas biogênicas na primeira fase, responsáveis pelo desenvolvimento dos eventos vasculares; numa segunda fase atuam outros mediadores, como citocinas (IL-1 e TNF- α), prostaglandinas e óxido nítrico. O edema também é caracterizado por apresentar um infiltrado celular intenso, destacando-se a presença de neutrófilos com produção de ROS (MORRIS et al., 2003).

Os resultados sugerem que F1Hi promove efeitos similares aos da carragenina na 1ª e 3ª hora, eliciando efeito pró-inflamatório. Entretanto, após a 6ª hora, F1Hi parece atuar de forma diferenciada da carragenina sobre o mecanismo de indução da migração celular, pois o grupo tratado com F1Hi apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com carragenina.

6 CONCLUSÕES

- As espécies do gênero *Handroanthus* possuem um grande potencial como fontes de detecção e isolamento de lectinas, uma vez que as plantas estudadas nesse trabalho apresentaram atividade lectínica.

- As frações protéicas obtidas de *H. impetiginosus* mostraram resultados satisfatórios de atividade hemaglutinante, principalmente com eritrócitos glutarizados de coelho.

- A F1Hi obtida a partir de sementes de *H. impetiginosus* exibiu elevado título de atividade lectínica, a partir da purificação parcial.

- A cromatografia em quitina rendeu um pico proteico adsorvido e eluído; é possível sugerir que se trate de uma lectina isolada e com especificidade para N-acetilglicosamina, no entanto, uma caracterização mais refinada é necessária nesse aspecto.

- Em modelo de edema de pata induzido por carragenina, F1Hi apresentou efeito pró-inflamatório após a 1ª hora.

- O ensaio de peritonite evidenciou ação pró-inflamatória de F1Hi similar à carragenina, até a 3ª hora; no entanto, após a 6ª hora F1Hi atuou de forma diferente da carragenina quanto ao mecanismo de indução da migração celular.

- Estudos mais aprofundados precisam ser realizados para avaliar se o efeito pró-inflamatório de F1Hi ocorre devido à ação de lectinas presentes na amostra e, também, para elucidar como F1Hi atua no processo de migração leucocitária.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; KUMAR, Vinay; FAUSTO, Nelson. **Bases das patologias:** Robins e contran. 7. ed. Rio de Janeiro - RJ: Elsevier, 2005. 1599 p.
- ABDEL-MAGEED, W.M.; BACKHEET, E.Y.; KHALIFA, A.A.; IBRAHEIM, Z.Z.; ROSS, S.A. Antiparasitic antioxidant phenylpropanoids and iridoid glycosides from *Tecoma mollis*. **Fitoterapia**. 2012, 83, 500–507.
- ALVES, H. M.; **A diversidade química das plantas como fonte de Fitoterápicos**. Caderno temático de química nova na escola. Nº 3, maio 2001.
- ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, V.B.M.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 2003;35(12):1674-81.
- 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 & Cell Biology**, v. 37, p. 1805-1814, 2005.
- AUDETTE, G. F.; VANDONSELAAR, M.; DELBAERE, L. T. J. The 2.2 Å resolution structure of the O (H) blood-group-specific lectin I from *Ulex europaeus*. **Journal of Molecular Biology**, vol.304, p.423-433. 2000.
- BANDEIRA, A.R.G.; BRANDÃO, J.M.; VASCONCELOS, J.L.A.; CAVALCANTI, C.L.B.; JÚNIOR, S.A.; BELTRÃO, E.I.C. Avaliação de Lectinas Conjugadas a Criptatos de Európio (III) em Tecidos Mamários Humanos Empregadas em Histoquímica. **Revista Saúde.Com**, v.7, n.2, p.100-108, 2011.
- BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILIPSON, J. D.; **Fitoterápicos**. 3. ed. São Paulo, SP : Artimed, 2012. 720 p.
- BATISTA, V. A.; COSTA, G. C.; ASSUNÇÃO, A. K. M.; SILVA, M. C. P.; LOPES, D. A.; ARAUJO, M. A. R.; SILVA, L. A.; GUERRA, R. N. M.; NASCIMENTO, F. R. F. Efeito do tratamento com nimesulida sobre a inflamação Granulomatosa em camundongos. **Ciência Saúde**, v.14, n. 1, p. 21-29, jan-jun, 2012.
- BENJAMIN, C.F.; FIGUEIREDO, R.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; BARJAFIDALGO, C. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 1997;30(7):873-81.36.
- BENTO, C.A.M.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; BARJAFIDALGO, C. Rat Paw Edema and Leukocyte Immigration Induced by Plant-Lectins. **Agents and Actions** 1993;38(1-2):48-54.

BOOKER, F.L.; BURKEY, K.O.; JONES, A.M. Re-evaluating the role of ascorbic acid and phenolic glycosides in ozone scavenging in the leaf apoplast of *Arabidopsis thaliana* L. **Plant Cell Environ.** 2012, 35, 1456–1466.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Especific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, Washington, v. 119, p. 419. 1954.

CARVALHO, F.C.; SOARES, S.G.; TAMAROZZI, M.B.; REGO, E.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C.. The Recognition of N-Glycans by the Lectin ArtinM Mediates Cell Death of a Human Myeloid Leukemia Cell Line. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11. 2011.

CHRISPEEL, M. J.; RAIKHEL, N.V. Lectin, lectin genes, ang their role in plant defense. **Plant Cell**, v. 3, p. 1-19. 1991.

CNiP PNI. *Tabebuia caraiba*. Disponível em: <http://www.cnip.org.br/banco_img.php>. Acesso em: 10 fev. 2014.

COELHO, L.C.B.B. e SILVA, M.B.R. Simple method to purity miligrama quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 295-300. 2000.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, Isoform 1 from seeds of *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261-273. 1995.

DE SANTANA, C.F.; DE LIMA, O.; D'ALBUQUERQUE, I.L.; LACERDA, A.L.; MARTINS, D.G. Antitumoral and toxicological properties of extracts of bark and various wood components of Pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*). **Institut Antibiotic**, 1968, 8, 89–94.

DINH, H. L.; HORI, K.; QUANG, N. H. Screeing and preliminary characterization of hemagglutinins in Vietnamse marine algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p. 89-97. 2009.

DRICKAMER, K.; TAYLOS, M. E. Evoling views of protein glycosylation. **Trends Biochenimistry Science**, v. 23, nº 9, p. 321-324. 1998.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin–carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, p. 462-467. 1997.

FERREIRA JÚNIOR, W. S.; LADIOC, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**, Recife, PE, v. 138, p. 238– 252, setembro. 2011.

FITCHES, E., EDWARDS, M. G., MEE, C., GRISHIN, E., GATEHOUSE, A. M. R., EDWARDS, J. P., GATEHOUSE, J. A. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider vrom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 61-70. 2004.

FLEMMING, C., ULRICH, M., SHWALL, G., SCHRODER, H. C., MULLER, W. E. G. W. Determination of lectin characteristics by a novel agglutination technique. **Analytical Biochemistry**, v. 205, p. 251-256. 1992.

FREIRE, M.G.M.; DESOUZA, I.A.; SILVA, A.C.M.; MACEDO, M.L.R.; LIMA, M.S.; TAMASHIRO, W.M.S.C. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon** 2003;42(3):275-80.

GABOR, F., KLAUSEGGER, U., WIRTH, M. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 35-47. 2001.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T; SHARON, N. What should be called a lectin. **Nature**, vol.285, p.66, 1980.

HASHIMOTO, G. Illustrated cyclopedia of brazilian medical plants. **Aboc-sha Kamakura**. 1996, 158.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunological research. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, p. 193-211. 1998.

KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 53-58. 2001.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; COREIA, M. T. S.; CAVALCANTE, M. S. M.; COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile protein of recognition – a review. **Carbohydrate Polymers**, v.26, p.219-230. 1995.

KIM, S.O.; KWON, J.I.; JEONG, Y.K.; KIM, G.Y.; KIM, N.D.; CHOI, Y.H. Induction of Egr-1 is associated with anti-metastatic and anti-invasive ability of beta-lapachone in human hepatocarcinoma cells. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 2007, 7, 2169–2176.

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

LALITHA, S.; SHADE, R. E.; MURDOCK, L. L.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; NIELSEN, S. S. Effectiveness of recombinant soybean cysteine proteinase inhibitors against selected crop pests. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: **Toxicology & Pharmacology**, v. 140, p. 227-235. 2005.

LI, Y. R.; LIU, Q. H.; WANG, H. X.; NG, T. B. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1780, p. 51-7, 2008.

LIENER, I. E. Toxic constituents of plant foodstuffs. **New York: Academic**, v. 2, p.502, 1980.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, pp. 1607-1609, 1999.

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

LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; HERNÁNDEZ-ROMERO, Y.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; MIRANDA-MOLINA, A.; REGLA, I.; MARTÍNEZ, A.; CASTILLO, E. Phenylpropanoid glycoside analogues: Enzymatic synthesis, antioxidant activity and theoretical study of their free radical scavenger mechanism. **PLoS One**. 2011, 6, e20115.

LORENZI, Harri. **Árvores Brasileiras: Manual: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2008. 383p.

LORENZI, Harri.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2008. 560 p.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275. 1951.

MALLER, N.P.; CONLIN, J.; HOGAN, V.; RAZ, A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. **Trends in Molecular medicine**, v.8, n.4, p.187-192. 2002.

MARONI, Beatriz Castro; STASI, Luiz Claudio di; MACHADO, Silvia Rodrigues. **Plantas medicinais do cerrado de Botucatu: Guia ilustrado**. São Paulo - Sp: Unesp, 2006. 203 p.

MO, H.; WINTER, H. C.; GOLDSTEIN, I. J; Purification and characterization of a Neu5Acalpha2-6Galbeta1-4Glc-GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **Jornal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10623-10629. 2000.

MONZO, A.; BONN, G. K.; GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **Trens in Analytical Chemistry**, v. 26, nº 5, p. 23-43. 2007.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; DE OLIVEIRA, J. T. A.; AINOZ, I. L. Plant lactins. Proceeding of the First Brazilian Congress on Proteins – COBRAP 90, 73-96. 1990.

MORRIS, M.R.; DEWITT, S.; LAFFAFIAN, I.; HALLETT, M.B. Phagocytosis by inflammatory phagocytes: experimental strategies for stimulation and quantification. **Methods in Molecular Biology**., v. 225, p. 35-46, 2003.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2013. 1271p.

NOMURA, K.; ASHIDA, H.; UEMURA, N.; KUSHIBE, S.; OZAKI, T.; YOSHIDA, M. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. **Phytochemistry**, v. 49, nº , p. 667-673. 1998.

PAUL, E. L.; LUNARDELLI, A.; CABERLON, E.; OLIVEIRA, C. B.; SANTOS, R. C. V.; BIOLCHI, V.; BASTOS, C. M. A.; MOREIRA, K. B.; NUNES, F. B.; GOSMANN, G.; OLIVEIRA, JR. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation *in vitro*. **Inflammation**, v. 32. 2009.

PEREIRA, José Carlos da Silveira. **Avaliação de efeitos antinociceptivo e antiedematoso de frações proteicas do extrato aquoso de *Combretum leprosum* mart.** 2013. 49 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró - Rn, 2013.

PESSOA JR., ADALBERTO; KILIKIAN, BEATRIZ V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2005. 444p.

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

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant Lectins: Versatile Proteins with Important Perspectives in Biotechnology. **Biotechnology and Genetic engineering Reviews**. Vol. 15. 1998.

PIMENTEL, J. C. **Caracterização das lectinas de folha de *Bauhinia monandra* (BmoLL) e de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll) através de sistemas potenciométricos e amperométricos**. 2009. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, na área de Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

POTT JUNIOR, Henrique; LOPES, Raphael T. G.. **Indução de edema em pata traseira de rato por uso de carragenina para estudo de droga antiinflamatória**. Disponível em: <<http://www.medcenter.com/medscape/content.aspx?id=26235&langType=1046>>. Acesso em: 07 fev. 2014.

QUEIROZ, Alexandre Flávio Silva de. **Efeito pró-inflamatório de CVL, uma lectina purificada da esponja marinha *Cliona varians***. 2008. 59 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - Rn, 2008.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN. W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. Syringae* pv *mori*. **Plant Science**, v. 160, p. 739-744.

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

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, pp. 385-405, 2004.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, nº5, p. 765-769. 1998.

SANTOSDEOLIVEIRA, R.; DIASBARUFFI, M.; THOMAZ, S.M.O.; BELTRAMINI, L.M.; ROQUEBARREIRA, M.C. Neutrophil Migration-Inducing Lectin from *Artocarpus integrifolia*. **Journal of Immunology** 1994;153(4):1798-807.

SARTIM, M.A. **Avaliação do envolvimento de Galatrox, uma lectina ligante de lactose isolado de peçonha de *Brothosp atrox*, no processo inflamatório**. 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas na área de Toxicologia) – Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2010.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, nº 11, p.53-62. 2004.

SHARON, N.; LIS, H. A century of lectin research. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, p. 488-491. 1998.

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 491, p. 1-16. 2001.

SILVA, M. D. C. Purificação e Caracterização de Glicoproteínas do Líquen *Cladonia verticillaris* para Aplicações Biotecnológicas. Monografia, Universidade Federal do Pernambuco, 2001.

SILVA, M. D. C. **Uma Lectina do Líquen *Cladonia verticillaris*: Purificação e Caracterização Parcial**. 2004. 57 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

SILVA, M.D.C.; SÁ, R.A.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; LIMA, T.A.; SANTOS, N.D.L.; ALBUQUERQUE, A.C.; XAVIER, H.S.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.63, p334-340. 2009.

SCHWARTZ, F. P.; SUROLIA, A.; BHAT, R. G.; PURIT, K. D. Thermodynamics of monosaccharide binding to Concanavalin A, Pea (*Pisum sativum*) lectin and lentil (*Lens culinaris*) lectin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, nº 11, p. 7668-7677. 1993.

SUO, M.; ISAO, H.; KATO, H.; TAKATO, F.; OHTA, T. Anti-inflammatory constituents from *Tabebuia avellanedae*. **Fitoterapia**, Kanazawa, Japan, v. 83, p. 1484–1488, agosto. 2012.

SUO, M.; OHATA, T.; TAKANO, F.; JIN, S. Bioactive Phenylpropanoid Glycosides from *Tabebuia avellanedae*. **Molecule**, 2013, 18, 7336-7345.

TAVARES, G. A.; CARACELLI, I.; BURGER, C. R.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; OLIVA, G. Crystallization and preliminary X-ray studies on the lectin from the seeds of *Cratylia mollis*. **Acta Crystallographica Section D- Biological Crystallography**, Great Britain, v. D52, p. 1046-1047. 1996.

TRIGUEIROS, V.; LOUGARRE, A.; ALI-AHMED, D.; RAHBÉ, Y.; GUILLOT, J.; CHAVANT, L.; FOURNIER, D.; PAQUEREAU, L. *Xerocomus chysenteron* lectin: identification of new pesticidal protein. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 1621, p. 292-298. 2003.

TWARDOWSCHYA, A.; FREITAS, C. S.; BAGGIOA, C. H.; MAYERA, B.; SANTOSA, A. C.; PIZZOLATTI, M. G.; ZACARIAS, A. A.; SANTOS, E. P.; OTUKI, M. F.; MRQUES, M. C. A. Antiulcerogenic activity of bark extract of *Tabebuia avellanedae*, Lorentz ex Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, p.455-459, Maio. 2008.

UEDA, S.; UMEMURA, T.; DOHGUCHI, K.; MATSUZAKI, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; IWASHIMA A. Production of anti-tumour promoting furanonaphthoquinones in *Tabebuia avellanedae* cell cultures. **Phytochemistry** 1994, 36, 323–325. *Molecules*, 2013, 18 7345.

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

VIJAYAN, M.C.; CHANDRA,N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v.9, p.707-714, 1999.

WANG, H.X.; NG, T.B. Purification of castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. **Protein Expression and Purification**, v. 32, p. 44-51. 2003.

WANG, R., KONG, C., KOLATKAR, P., CHUNG, M. C. M. A novel dimer of a C-type lectin-like heterodimer from the venom of *Calloselasma roddostoma* (Malayan pit viper). **FEBS Lettrs**, v. 508, p. 447-453. 2001.

WOO, H.J.; CHOI, Y.H. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by beta-lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity. **International Journal of Oncology**. 2005, 26, 1017–1023.

YOSHIZUMI, A.; KANAYAMA, Y. M.; IDE, M.; KITANO, H. Self-assembled monolayer of sugar-carrying polymer chain: sugar balls from 2-methacryloyloxyethyl D-glucopyranoside. **Langmuir**, v. 15, 482-488. 1999.

ZATTA, P.F.; CUMMINGS, R. Lectins and their uses as biotechnological tool. **Biochemical Education**. V. 20, nº1, p. 2-9. 1992.