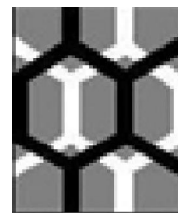




UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA - PPGQB



IQB

THEOLYTA SANTOS DE ARAÚJO

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA
DA LECTINA DE SEMENTE DE *Canna limbata* Roscoe**

Maceió

2011

THEOLYTA SANTOS DE ARAÚJO

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
AVALIAÇÃO ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA
DA LECTINA DE SEMENTE DE *Canna limbata* Roscoe**

Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha

Maceió

2011

**Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- A663i Araújo, Theolyta Santos de.
Isolamento, purificação, caracterização e avaliação antinociceptiva e anti-inflamatória da lectina de semente de *Canna limbata* Roscoe / Theolyta Santos de Araújo. – 2011.
120 f. : il. tabs., graf.
- Orientador: Bruno Anderson Matias da Rocha.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2011.
- Bibliografia. f. [95]-118.
Anexos: f. [119]-120.
1. *Canna limbata*. 2. Lectina – Purificação. 3. Atividade Antinociceptiva.
4. Atividade anti-inflamatória. I. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax (82) 3214-1384
email: cpgqb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de **Theolyta Santos Araújo**, intitulada: **“Isolamento, Purificação, Caracterização e Avaliação Antinociceptiva e Antiinflamatória de Lectina de Semente de *Canna limbata* Roscoe”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 03 de agosto de 2011, às 10h, na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias Rocha
Orientador – DBBM/UFC/PPGQB/UFAL

Prof.^a Dr.^a Fabiane Caxico de Abreu Galdino
PPGBQ/IQB/UFAL

Prof.^a Dr.^a Eliane Aparecida Campesatto Mella
ICBS/UFAL

“Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo, o que nos valoriza e também mais nos torna conscientes da nossa responsabilidade, é que os outros crêem em nós. Não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos.”

(Albert Einstein)

Aos meus pais, Tereza Maria e Francisco Teobaldo, pela dedicação e por sempre priorizarem, a minha educação.

Agradecimentos

À Deus, por se fazer presente em minha vida, guiando sempre meus passos, dando força, entusiasmo e esperança para vencer os obstáculos;

Aos meus pais, pelo apoio, carinho, amor, amizade e incentivos em todas as escolhas que eu fiz.

À Tia Izabel e a vó Adelita pelo apoio.

À Tia Leda pelo carinho de sempre.

Ao meu avô Theobaldo (In Memoriam) e a Tia Nely (In Memoriam) pelos momentos especiais.

Ao meu orientador Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha, pela oportunidade, pelo incentivo e conhecimentos transmitidos.

A Prof^ª. Dra. Sônia Salgueiro Machado pelo incentivo, atenção, recepção em seu laboratório e pela colaboração na banca de qualificação.

A Prof^ª. Dra. Eliane Aparecida Campesatto Mella, por ter contribuído para o desenvolvimento desta dissertação e pela colaboração na banca de defesa.

A Prof^ª. Dra. Fabiane Caxico, pelo apoio e pela colaboração na banca de qualificação e na banca de defesa.

A Prof^ª. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira, pela recepção no seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Benildo Souza Cavada do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Ao Prof. Dr. Jorge Luis Martins (UFPEL-RS).

Aos colegas e amigos Alice Ferro, Irys Adellayde, Jéssica Guerra, Joaquim Wanderley, Marcelo e Rodofodo Laboratório de Enzimologia e Biotecnologia Vegetal pela ajuda, amizade e momentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana que permitiu o uso do seu laboratório e Dra. Luciana da S. Viana do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais pela ajuda.

A Prof^ª. Dra Cristina Delgado que permitiu o uso do liofilizador e ao aluno Cantídio Neto pela ajuda.

Ao Prof. Dr. Vitor Lopes pela ajuda durante o estágio em docência.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) Aline Queiroz, Angélica Dantas, Carolina Barbosa, Débora Fernandes, Fábio, Luiz Henrique, Morgana Vital e Sandyane, pela grande ajuda nos experimentos e por momentos de descontração. E em especial aos amigos Adolfo Maleski e Maria Alice, pela grande ajuda nos experimentos e por momentos de descontração em Maceió e em Fortaleza.

Ao técnico Aldy, pela boa vontade e ajuda.

Aos colegas do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Claudener, Eduardo, Mayara Queiroz, Raquel Benevides e Vanir Reis pela grande ajuda nos experimentos.

Aos colegas e aos professores do programa de pós-graduação do IQB pelas trocas de experiências vivenciadas durante as disciplinas.

A Ana Soraya, Camila Vasconcelos, Ellen Virgínia, Gabriela Muniz, Márcia Barros, Kátia Rejane, Michelle Almeida, Michelle Braga, Larissa Soares, Patrícia Vasconcelos, Sabrina Araújo, Walleska Bismaida e Willians Epifânio, pela amizade e incentivo.

Ao programa de pós-graduação do IQB pela oportunidade da realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que, mesmo anonimamente colaboraram direta ou indiretamente para que eu chegasse até aqui.

*A todos vocês,
Muito Obrigada!*

RESUMO

As lectinas representam um grupo de proteínas que são capazes de reconhecer e se ligar especificamente, e reversivelmente, a carboidratos e glicoconjugados. O objetivo desse estudo foi purificar, caracterizar e realizar a avaliação da atividade farmacológica antinociceptiva e anti-inflamatória da lectina de sementes *Canna limbata*. Os extratos protéicos foram obtidos por trituração das sementes e através de extração salina seguida de precipitação com sulfato de amônio. O isolamento e purificação de moléculas de lectina foram realizados através de cromatografia de afinidade por quitina. O acompanhamento da purificação foi realizado por ensaios de atividade hemaglutinante e eletroforese (SDS-PAGE). A caracterização bioquímica da molécula indica uma proteína tetramérica (~50 kDa) constituída de subunidade de aproximadamente 12 kDa. Visando a avaliação da atividade antinociceptiva e a atividade anti-inflamatória dessa lectina, foram utilizados modelos murinos, tais como: ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético, ensaio de nocicepção induzida por formalina, ensaio de placa quente e peritonite induzida por Zymosan A, testados nas doses de 0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg e 10 mg/kg (v.o.). No ensaio de contorções abdominais, todas as doses induziram inibição significativa da resposta nociceptiva, resultando em 60,3 % (0,1mg/Kg), 52,1 % (1mg/Kg), 70,8 % (5mg/Kg) e 76,1 % (10mg/Kg) de inibição. Na primeira fase (neurogênica) do ensaio formalina, as doses da lectina não reduziram de forma significativa o tempo de lambida da pata do camundongo. Ainda nesse ensaio, na fase inflamatória, as doses de 1 mg/kg, 5 mg/kg e 10 mg/kg induziram efeito estatisticamente significativo com 73,8 %, 57,6 % e 96,02 % de inibição, respectivamente. No ensaio de placa quente, o tratamento com todas as doses da lectina não foi capaz de aumentar de forma estatisticamente significava o tempo de permanência do animal sobre a placa. O ensaio de peritonite induzida por Zymosan A confirmou a atividade anti-inflamatória da lectina, que foram capazes de inibir de forma estatisticamente significativa a migração celular, com inibição de 29,68 % (0,1 mg/kg), 41,74 % (1 mg/kg), 48,90 % (5 mg/kg) e 43,74 % (10 mg/kg). Dessa forma, os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que a lectina de sementes de *Canna limbata* apresenta atividade anti-inflamatória e antinociceptiva periférica, podendo ser empregados como ferramenta farmacológica no estudo de condições inflamatórias e nociceptivas, auxiliando na descoberta de novos fármacos.

Palavras chave: *Canna limbata*. Lectina. Purificação. Atividade Antinociceptiva. Atividade Anti-inflamatória.

ABSTRACT

Lectins represent a group of proteins that are able to recognize specifically and reversibly bind to carbohydrates and glycoconjugates. The aim of this study was to purify, characterize and conduct the evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory pharmacological activity of a lectin from seeds of *Canna limbata*. The protein extracts were obtained by powders the seeds and by salt extraction followed by precipitation with ammonium sulfate. The isolation and purification of lectin molecules have been performed by chitin affinity chromatography. The monitoring of the purification was performed by hemagglutination activity assays and electrophoresis (SDS-PAGE). The biochemical characterization of the molecule indicates a tetrameric protein (~ 50 kDa) composed by subunits consisting of monomers of 12 kDa. In order to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activities of this lectin, murine models were used, such as acetic acid-induced writhing, nociception induced by formalin, hot plate and peritonitis induced by Zymosan A assays. In all assays, the doses tested were 0.1 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg and 10 mg/kg (p. o.). In the writhing test, all doses induced significant inhibition of nociceptive response, resulting in 60.3 % (0.1 mg/kg), 52.1 % (1 mg/kg), 70.8 % (5 mg/kg) and 76.1 % (10 mg/Kg) of inhibition. In the first phase (neurogenic) of the formalin test, doses of the lectin did not reduce so significantly the licking of the paw by the mouse. Although, in the inflammatory phase, the doses of 1 mg/kg, 5 mg/kg and 10 mg/kg induced a statistically significant inhibition with 73.8 %, 57.6 % and 96.02 % of inhibition, respectively. In the hot plate test, treatment with all doses of the lectin was not able to increase statistically significantly the time the animal remained on the plate. The test of peritonitis induced by Zymosan A confirmed anti-inflammatory activity of the lectin, which were capable of inhibiting cell migration, with inhibition of 29.68 % (0.1 mg/kg) 41.74 % (1 mg/kg) 48.90 % (5 mg/kg) and 43.74 % (10 mg/kg). Thus, the present results showed that the lectin from *Canna limbata* have anti-inflammatory and peripheral antinociceptive activities and could be employed as pharmacological tools to study nociceptive and inflammatory conditions, assisting in drug discovery.

Keywords: *Canna limbata*. Lectin. Purification. Antinociceptive Activity. Anti-inflammatory Activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da aglutinação por lectinas.....	30
Figura 2. Subdivisão de lectinas de plantas de acordo com a característica estrutural.....	33
Figura 3. Representação por Doking molecular da ligação da lectina a um carboidrato. (A) As linhas pontilhadas representam pontes de hidrogênio. PDB: 3A0K.....	38
Figura 4. <i>Canna limbata</i> Roscoe.....	45
Figura 5. Sinais clínicos da inflamação.....	46
Figura 6. Representação esquemática da migração de leucócitos para o tecido lesado.....	48
Figura 7. Mediadores envolvidos na nocicepção.....	52
Figura 8. Sementes de <i>Canna limbata</i>	56
Figura 9. Farinha de <i>Canna limbata</i>	56
Figura 10. Protocolo de extração das proteínas em tampão aquoso de semente da <i>Canna limbata</i>	58
Figura 11. Coluna de quitina conectada a bomba de fluxo peristáltica.....	59
Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e 2-mercaptoetanol.....	61
Figura 13. Determinação da atividade hemaglutinante.....	62
Figura 14. Camundongos da linhagem Swiss.....	64
Figura 15. Esquema do ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.....	66
Figura 16. Contorção abdominal de um camundongo induzida por ácido acético 0,6 %.....	66

Figura 17. Injeção de 20 µL de uma solução de formalina 2,5 % na face dorsal da pata traseira do animal.....	67
Figura 18. Esquema do ensaio de nocicepção induzida por formalina.....	67
Figura 19. Camundongo lambendo a pata em resposta a injeção subplantar de formalina 2,5 %.....	69
Figura 20. Ilustração de um camundongo em placa quente.....	69
Figura 21. Esquema do ensaio de placa quente.....	69
Figura 22. Esquema do ensaio de peritonite induzida por Zymosan A.....	70
Figura 23. Coleta do lavado peritoneal após 6 horas da injeção intraperitoneal de Zymosan A.....	71
Figura 24. Eletroforese Gel de Poliacrilamida 12 % em presença de SDS e 2-Mercaptoetanol.....	75
Figura 25. Pico retido eluído com ácido acético em cromatografia de afinidade em coluna de quitina com refluxo. (1) Fração 50-90% da precipitação com sulfato de amônio. (2) Pico retido da coluna de quitina. (3) Pico majoritário da coluna Mono P na faixa de pH 3,0 a 7,0.....	76
Figura 26. Cromatofocalização em coluna Mono P na faixa de 3,0 a 7,0 em sistema de cromatografia líquida de alta performance (AKTA).....	77
Figura 27. Espectrometria de massas ESI-MS do pico retido da cromatografia de afinidade em coluna de quitina de sementes de <i>Canna limbata</i> . Figura 27A. Espectro deconvoluído indicando massa 49, 676 kDa. Figura 27 B. Espectro MS multicarregado da lectina de <i>Canna limbata</i> a massa molecular.....	78
Figura 28. Purificação da lectina de <i>Canna limbata</i> em HPLC.....	79

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Cromatografia de afinidade em coluna de quitina.....73
- Gráfico 2.** Efeito da lectina de sementes de *Canna limbata* (0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/ Kg, v.o) e da dipirona (40 mg/kg, v.o), no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético. Resultados expressos como média \pm e.p.m. de 6 animais, verificados por ANOVA One Way seguido do Teste de Dunnet (*P<0,05, **p<0,01).....82
- Gráfico 3 (A e B).** Perfil antinociceptivo da lectina de sementes de *Canna limbata* (0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg) e da indometacina (35,7 mg/kg) por administração v.o. no ensaio de nocicepção induzida por formalina. O painel A representa a fase neurogênica do teste (1ª fase) e o painel B a fase inflamatória (2ª fase). Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais por grupo (*P<0,05,**P<0,01 no teste ANOVA One Way seguido do Teste de Dunnet).85
- Gráfico 4.** Perfil antinociceptivo central da lectina de sementes de *Canna limbata* (0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg, v.o.) e da morfina (4,3 mg/kg, s.c.) no ensaio de placa quente (n=6). Tempo em segundos que o animal permaneceu sobre a placa aquecida (54 \pm 1 °C). Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais por grupo (* P<0,05 no teste ANOVA One Way seguido do Teste de Dunnet).....87
- Gráfico 5.** Efeito da lectina de sementes de *Canna limbata* (0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg, v.o.) e da indometacina (35,7 mg/kg v.o.), no ensaio de peritonite induzida por Zymosan A em camundongos. Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais por grupo (*P<0,05, **P<0,01 no teste ANOVA One Way seguido do Teste de Dunnet).....89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificidade de ligação das lectinas vegetais a carboidratos.....	32
Tabela 2. Aplicações de lectinas.....	43
Tabela 3. Mediadores da inflamação.....	49
Tabela 4. Tabela de purificação da lectina de <i>Canna limbata</i>	74
Tabela 5. Sequencias <i>N</i> -terminais da lectina de <i>Canna limbata</i>	79
Tabela 6. Perfil antinociceptivo central da lectina de sementes de <i>Canna limbata</i> (0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg, v.o.) e da morfina (4,3 mg/kg, s.c.) no ensaio de placa quente (n=6). Tempo em segundos que o animal permaneceu sobre a placa aquecida (54±1 °C).....	87

ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

ANOVA = Teste estatístico de análise de variância

Bis-tris = Bis - (2-hidroxietil)-amino-tris-(hidroximetil)-metano

BSA = Albumina do Soro Bovino

BK = Bradicinina

C = Sistema de complemento

Ca²⁺ = Íon cálcio

CMC = Carboximetilcelulose

COX = Ciclooxygenase

DDT = Ditioneitol

DI_{50%} = Dose que inibe a resposta em 50%

DNA = Ácido desoxirribonucleico

EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético

EM = Espectrometria de Massa

EPM = Erro padrão da média

ESI-MS = Ionização por Eletrospray-Espectrometria de massa

fMLP = N-formil-N-metionil-N-leucil-L-fenilalanina

FQN = Fator quimiotático para neutrófilos

Gal = Galactose

GalNAc = N-acetil-D-galactosamina

GlcNAc = N-acetil-D-glicosamina

HCl = Ácido clorídrico

HPLC = Cromatografia líquida de alta eficiência

IL = Interleucina

i.v = Intravenoso

i. p = intraperitoneal

kDa = Kilodalton

LPS = Lipopolissacarídeo

LTB₄ = Leucotrieno 4

M = Molar

mA = Miliampere

min = minuto

Mn²⁺ = Íon manganês

MS = *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)

MS/MS = *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*

NaCl = Cloreto de sódio

NCBI = *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)

N = Normal

nm = Nanômetro

P.A. = Pureza analítica

PAF = Fator ativador plaquetário

PAGE = Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

PBS = Solução tampão fosfato salino

PG = Prostaglandina

PGE₂ = Prostaglandina da série E₂

pH = Potencial Hidrogênico

Poliacrilamida = Mistura de dois polímeros, acrilamida e bisacrilamida

RNA = Ácido ribonucleico

SDS = Dodecil Sulfato de Sódio

SNC = Sistema Nervoso Central

t = tempo

TEMED = N,N',N'-tetrametil-1,2-diaminometano

TFA = Ácido Trifluoracético

Tris-HCl = Tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorídrico

UI = Unidades Internacionais

UH/mg = Unidades hemaglutinantes por miligrama de proteína

v.i = Via intraperitoneal

v. o = Via oral

v. pl = Via intraplantar

v. sc = Via subcutânea

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Considerações Iniciais.....	21
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Geral.....	27
2.2 Específicos.....	27
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	28
3.1 Lectinas.....	29
3.1.1 Histórico.....	29
3.1.2 Detecção.....	30
3.1.3 Ocorrência.....	31
3.1.4 Classificação.....	32
3.1.4.1 Classificação Quanto Especificidade a Carboidratos.....	32
3.1.4.2 Classificação Estrutural.....	33
3.1.4.3 Classificação em Família Evolutivamente Relacionada.....	34
3.1.4.3.1 Lectinas de Monocotiledôneas Ligantes à Manose.....	36
3.1.5 Especificidade por Carboidratos.....	37
3.1.6 Função e Papel Fisiológico.....	38
3.1.7 Atividade Biológica.....	39
3.1.8 Purificação.....	41
3.1.9 Aplicação.....	42
3.2 Classificação Botânica da Espécie <i>Canna limbata</i> Roscoe.....	43
3.3 Resposta Inflamatória.....	45
3.3.1 Eventos Vasculares.....	46
3.3.2 Eventos Celulares.....	47
3.3.3 Mediadores Inflamatórios	48
3.4 Dor e Nocicepção.....	50
3.4.1 Classificação dos Diferentes Tipos de Dor.....	51
3.4.2 Fisiologia da Dor.....	52

4 EXPERIMENTAL.....	54
4.1 Atividades Desenvolvidas e Locais de Realização.....	55
4.2 Isolamento, Purificação e Detecção da Lectina de Sementes de <i>Canna limbata</i>	55
4.2.1 Material Botânico.....	55
4.2.1.1 Obtenção das Sementes de <i>Canna limbata</i>	55
4.2.1.2 Preparação da Farinha de Sementes de <i>Canna limbata</i>	56
4.2.1.3 Extração de Proteínas.....	56
4.2.2 Purificação da Lectina de Sementes de <i>Canna limbata</i> por Cromatografia de Afinidade em Quitina (polímero de N-acetilglicosamina).....	59
4.2.3 Determinação da Concentração de Proteínas.....	60
4.2.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e 2-Mercaptoetanol.....	60
4.2.5 Determinação da Atividade Hemaglutinante.....	61
4.2.6 Determinação da Atividade Específica.....	62
4.2.7 Cromatofocalização em Coluna Mono P da Lectina da Semente de <i>Canna limbata</i>	62
4.2.8 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de Amônio Quaternário (Mono Q HR 5/5) Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (Sistema ÄKTA) da Lectina de <i>Canna limbata</i>	62
4.2.9 Sequenciamento Protéico por Degradação de Edman.....	63
4.2.10 Análise por Espectrometria de Massa ESI-MS.....	63
4.3 Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória.....	64
4.3.1 Animais.....	64
4.3.2 Substâncias Utilizadas.....	65
4.3.3 Ensaio de Contorção Abdominal Induzida por Ácido Acético.....	65
4.3.4 Ensaio de Nocicepção Induzida por Formalina.....	66
4.3.5 Ensaio da Placa Quente (HOT PLATE TEST).....	68
4.3.6 Ensaio de Peritonite Induzida por Zymosan A.....	69
4.3.7 Análise Estatística.....	71
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	72
5.1 Isolamento, Purificação e Detecção da Lectina de Sementes de <i>Canna limbata</i>	73
5.2 Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória da Lectina de Sementes de <i>Canna limbata</i>	80

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	93
REFERÊNCIAS.....	95
ANEXOS.....	119
ANEXO A - Folha de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	120

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

As plantas têm sido consideradas importantes ferramentas na descoberta de fármacos (STRHOL, 2000), pois com o metabolismo dos vegetais pode-se obter uma grande variedade de produtos naturais, com metabólitos que diferem na complexidade química e atividade biológica. Os estudos destes metabólitos auxiliam principalmente a compreensão da fisiologia das plantas, da quimiotaxonomia e na investigação de protótipos para novos fármacos. (GABIUS et al, 2002; VAN DAMME et al, 1998).

O Brasil inclui-se entre os países de maior biodiversidade mundial, abrigando cerca de 50 mil espécies de plantas, distribuídas em grandes biomas (Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Amazônia, Caatinga) com características distintas que conferem uma riqueza e diversidade de vegetação (SKORUPA & VIEIRA, 2004). Deste modo, o Brasil é considerado um país com uma enorme biodiversidade vegetal e com diversas plantas com alto valor alimentício e medicinal (SOUZA & FEOFINI, 2006).

Muitas classes de compostos orgânicos têm evidenciado promissores efeitos biológicos e diversos constituintes apresentam potência similar ou superior a de um fármaco sintético (CECHINEL FILHO et al., 2003).

O emprego de técnicas modernas de farmacologia, bioquímica, toxicologia e de biologia molecular renovou o interesse na procura de novos fármacos ou de protótipos de fármacos a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2000; CALIXTO et al., 2000).

O enorme interesse de muitos pesquisadores em investigar plantas com atividade antinociceptiva e atividade anti-inflamatória deve-se à sua vasta aplicação nas diversas patologias, além disso, existe a limitação apresentada pela indústria farmacêutica dos fármacos disponíveis no mercado quanto aos efeitos colaterais e sua eficácia. Assim, faz-se necessário a descoberta de novos fármacos capazes de contribuir para o tratamento da inflamação e da dor, uma vez que estas acometem a maioria da população.

Deste modo, a descoberta de novos fármacos derivados de plantas é importante para ampliar a intervenção terapêutica. Dentre as biomoléculas de interesse provenientes das plantas estão as lectinas.

Nos últimos anos, as lectinas têm atraído o interesse da indústria farmacêutica, por sua capacidade de ligação específica nos resíduos de carboidratos localizados na superfície das células. Por via oral, as lectinas podem ser ferramentas biotecnológicas atrativas devido à sua

alta estabilidade, boa resistência à digestão enzimática no trato gastrointestinal (inclusive em meio ácido), por serem facilmente disponíveis, por terem elevada especificidade a carboidratos e por suportarem modificações químicas e processo de conjugação. Deste modo, têm aplicações em muitas áreas, incluindo imunologia, estudos bioquímicos, estruturas das membranas, identificação celular, histologia, citoquímica, entre outros (ZATTA & CUMMINGS, 1992; POCHÉL & IRACHE, 1998).

As lectinas representam um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas, de origem não imune, que apresentam propriedades em comum de se unir a carboidratos com alta especificidade. Elas são largamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em animais, plantas e microrganismos. Nos animais e microrganismos elas podem servir para mediar o reconhecimento biológico de diversos eventos relacionados à comunicação celular, desenvolvimento, defesa, metástase tumoral, inflamação, entre outros (CAVADA et al., 2001). Apesar de sua abundância em muitas plantas, as lectinas de plantas não possuem sua verdadeira função fisiológica claramente definida. Entre algumas funções propostas para lectinas de plantas estão incluídas: armazenamento ou transporte de carboidratos em sementes, inibição do crescimento de fungos (SHARON & LIS, 1989) ou atividade inseticida (TRIGUEIROS et al., 2003).

Por estarem envolvidas no reconhecimento de diversos eventos biológicos, as lectinas, estão diretamente relacionadas a processos como controle do tráfico intracelular de glicoproteínas, adesão de agentes infectantes a células hospedeiras, recrutamento de leucócitos em inflamações, assim como em interações celulares no sistema imune, em tumores malignos e metástases (SHARON & LIS, 1989).

Comumente, as lectinas estão distribuídas por toda parte das plantas. A maior parte, porém, encontra-se nos órgãos de armazenamento (sementes). Outras partes da plantas tal como folhas, caule, raízes ou flores, contêm apenas pequenas quantidades as quais não são necessariamente idênticas na estrutura ou especificidade a carboidratos, como as lectinas dos órgãos de armazenamento. A localização intracelular das lectinas tem sido discutida há algum tempo. É certo que a maioria das lectinas típicas que ocorrem em órgãos de armazenagem esteja localizada em organelas celulares especiais que são produzidas a partir de vacúolos e são denominadas de corpos protéicos (RUDIGER, 1998).

As lectinas são sintetizadas na forma de pró-proteínas no retículo endoplasmático, e após sofrerem processamentos co e/ou pós-traducionais originam a proteína madura. Esse processamento envolve: remoção de um peptídeo sinal de 20-30 aminoácidos, clivagem proteolítica da cadeia precursora, perda da extremidade C-terminal, remoção de carboidrato

estrutural e a ligação das extremidades *C*- e *N*-terminal originais. Durante ou após o transporte da lectina até os vacúolos de armazenamento, via complexo de Golgi, podem ocorrer modificações pós-transducionais nas unidades de carboidratos, ocasionando perdas dessas moléculas. Frequentemente, essas modificações geram cadeias polipeptídicas. Nesses polipeptídeos a sequência sinal da extremidade *N*-terminal é composta de 29 resíduos, seguidos da cadeia β e logo depois da cadeia α . A clivagem da ligação entre a cadeia β e α , originando a lectina madura, acontece nos corpos protéicos, local do último estágio da biossíntese da lectina. Embora a localização nos corpos protéicos seja característica para a maioria das lectinas conhecidas, há exceções, como exemplo, algumas Leguminosas como *Datura stramonium* e *Artocarpus integrifolia*, as quais são encontradas associadas à parede celular (RUDIGER, 1998).

Avanços importantes têm sido feitos na análise estrutural de lectinas com sequências primárias determinadas, usando difração de raios X e análise de ressonância magnética nuclear. As estruturas de lectinas têm sido determinadas e a resolução de novas estruturas tem aumentado constantemente. A determinação dessas estruturas permitiu o estudo da interação lectina-carboidrato a nível molecular, evidenciando também que cada família de lectinas tem um enovelamento particular e característico, além de motivos estruturais que reconhecem açúcares complementares (PEUMANS et al., 2000).

Comumente, as lectinas consistem de duas a quatro subunidades, cada uma com massa molecular variando de 14 a 30 kDa e com um sítio de ligação para carboidratos (SHARON & LIS, 1993). A região molecular de ligação ao carboidrato é denominada de domínio de reconhecimento de carboidrato, sendo que cada subunidade de lectina possui pelo menos um domínio. A divalência ou polivalência permite a interação com açúcares localizados na superfície de células adjacentes, resultando em aglutinação destas células. Os sítios para ligação de carboidratos reconhecem e ajustam-se através de um complexo sistema de ligação de hidrogênio. A formação do complexo carboidrato-proteína envolve o deslocamento da molécula associada com o grupo polar da proteína e em torno do carboidrato altamente polar, com o estabelecimento de novas pontes de hidrogênio; essas últimas ligações e forças de Van de Waals são denominantes na estabilização da ligação (QUIOCHO, 1986; CALVETE et al., 1999).

Os carboidratos são moléculas extremamente flexíveis e além do movimento molecular, associado às configurações estruturais diferentes entre si, dificulta um único modo de reconhecimento das moléculas dos carboidratos pelas lectinas. Apesar do sítio de ligação apresentar alta especificidade de reconhecimento, em nível milimolar, para aumentar a

possibilidade da lectina complexar com o carboidrato, muito frequentemente, sítios secundários (subsítios) são ativados automaticamente, de forma que a proteína muda a conformação espacial, capturando de imediato seu carboidrato específico. Este mecanismo é útil até mesmo quando é exigido que mais de uma subunidade, diferentes ou não, sejam ativadas, o que ocasiona uma diferenciação total na estrutura quaternária da proteína (LORIS, 2002).

Habitualmente, pesquisas envolvendo lectinas estão focadas em sua habilidade de interagir com açúcares específicos, considerando que a especificidade possa indicar diferentes atividades biológicas (CAVADA et al., 2001).

Diversos estudos com lectinas vegetais têm demonstrado que lectinas possuem a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos murinos e humanos, estimular macrófagos e mastócitos, induzir migração de neutrófilos, além de apresentarem também, quando administrada endovenosamente, propriedades anti-inflamatórias (ASSREUY et al., 2002).

As lectinas de plantas têm mostrado efeitos anti-inflamatórios e pró-inflamatórios. Os efeitos anti-inflamatórios em células ocorre quando os leucócitos deixam de se deslocar para locais inflamados, geralmente relacionada à adesão das células endoteliais. Já os efeitos pró-inflamatórios ocorrem quando há migração de leucócitos para locais inflamados. Ambos os processos envolvem intrinsecamente células específicas e reconhecimento de carboidratos. Devido ao seu reconhecimento para carboidratos, as lectinas podem ser utilizadas como substâncias terapêuticas farmacológicas ou ferramentas para descoberta de novas abordagens para investigar os mecanismos inflamatórios (ALENCAR et al., 2007).

A reação inflamatória é um mecanismo fisiopatológico de resposta à invasão por um agente infeccioso ou apenas reação a uma lesão de natureza variada (térmica, química ou mecânica), sendo representada por um conjunto de reações locais e gerais do organismo. Este mecanismo é composto por vários fenômenos complexos que se associam e se complementam uns aos outros formando uma reação em cascata, que envolve uma complexa interação de células inflamatórias e vasculares (TEDGUI & MALLAT, 2001).

A resposta inflamatória consiste em uma série de eventos celulares e vasculares desencadeados por um tecido vivo vascularizado, na tentativa de combater a agressão de um agente estranho, em geral exógeno ao organismo. Essa reação pode resultar em cura e eliminação do patógeno, com ou sem sequelas, como cicatrização e fibrose, ou evoluir para um processo crônico, se a substância nociva persistir. Em certas ocasiões, o agente agressor

desencadeador da inflamação pode ser endógeno, como no caso dos distúrbios auto-imunes, situação na qual a resposta inflamatória pode ser prejudicial (RANG et al., 2007).

Danos teciduais como a inflamação resultam em dor. A dor é uma experiência complexa e de múltiplas dimensões, que geralmente se origina no sítio da lesão, sendo transmitida pelo sistema nervoso periférico, processado em diversos níveis de sistema nervoso central e, finalmente percebida no córtex cerebral (PRADO & DEL BEL, 1998).

A dor é uma das grandes preocupações da humanidade. Desde os primórdios do ser humano, conforme sugerem alguns registros gráficos da pré-história, o homem sempre procurou esclarecer as razões que justificassem a ocorrência de dor e os procedimentos destinados para seu controle. Estudos demonstram que a dor afeta os mais variados domínios da qualidade de vida humana, primariamente físicos e emocionais. O efeito da dor depende da extensão, duração, intensidade, significando que a dor, bem como a doença relacionada, são características individuais (NIV & KREITLER, 2001).

Os anti-inflamatórios não-esteroidas (AINEs) destacam-se entre os fármacos mais usados na prática médica devido sua eficácia em suprir a dor e a inflamação (ONG et al., 2007). No entanto, esses fármacos por inibirem a ciclooxigenase (COX), inibem as prostaglandinas que é responsável por seus principais efeitos colaterais como: problemas gastrintestinais, disfunção plaquetária, comprometimento renal e broncoespasmo (RANG et al., 2007). Deste modo, devido os problemas relacionados aos efeitos colaterais dos AINEs a descoberta de novos protótipos com atividade e segurança terapêutica melhorados tem sido uma busca constante (SANTOS et al., 2007).

Tendo em vista a importância da pesquisa de novos fármacos para o tratamento da inflamação e da dor que apresentem melhores características que os atuais, estudos para avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória são fundamentais. As lectinas de monocotiledôneas normalmente atuam reconhecendo moléculas de manose que é o componente do glicocálix das células envolvidos na resposta inflamatória, o que sugere este grupo de proteínas apresenta tal potencial de reconhecer e ligar-se a essas células. Deste modo, a habilidade que as lectinas têm de interagir especificamente com os carboidratos, transformaram estas proteínas em fundamentais ferramentas para as diversas linhas de pesquisas biológicas. A possibilidade de purificação e caracterização de sua estrutura molecular as torna potencialmente úteis para fins terapêuticos. Portanto, através das informações mencionadas pretende-se, purificar e caracterizar lectinas obtidas das sementes de monocotiledôneas da espécie *Canna limbata* para investigação da ação antinociceptiva e anti-inflamatória.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Extrair, isolar, purificar, caracterizar e realizar a avaliação da atividade farmacológica antinociceptiva e anti-inflamatória da lectina obtida de sementes de *Canna limbata*.

2.2 Específicos

- ✓ Purificar a lectina por cromatografia de afinidade e troca iônica;
- ✓ Determinar a concentração de proteínas nas frações solúveis obtidas;
- ✓ Determinar a atividade hemaglutinante e atividade específica das frações e da proteína purificada;
- ✓ Determinar a massa molecular da lectina
- ✓ Determinar a sequência *N*-terminal da lectina;
- ✓ Avaliar a atividade antinociceptiva em modelos animais de nocicepção (contorções abdominais induzidas por ácido acético e nocicepção induzida por formalina);
- ✓ Investigar uma possível ação central no modelo de placa quente;
- ✓ Pesquisar a atividade anti-inflamatória em modelo animal de inflamação aguda (migração celular induzida por Zymosan A).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 Lectinas

3.1.1 Histórico

As lectinas foram originalmente descritas em 1954 por Boyd e colaboradores como substâncias contidas em extratos de plantas, capazes de aglutinarem células vermelhas. A promoção de aglutinação de eritrócitos por extratos de plantas foi verificada por Stillmark em 1888, estudando fatores de toxicidade em *Ricinus communis* (mamona) (KENNEDY et al., 1995). Ele denominou a substância responsável por essa atividade de ricina. No ano seguinte, Hellin demonstrou a presença de uma hemaglutinina tóxica em extratos de *Abrus precatorius* (jequiriti), a qual denominou de abrina. (SHARON & LIS, 1989).

Até a primeira metade do século passado, as lectinas eram tratadas por denominações como hemaglutinina ou aglutinas. Em 1898, Elfstrand propôs o termo hemaglutinina para proteínas vegetais como ricina e abrina, caracterizadas pela atividade hemaglutinante que desenvolviam (OLSNES & KOZLOV, 2001). Somente em 1952, Walkins e Morgan demonstraram que esta característica estava fundamentada na atividade específica de ligação de uma dada lectina a carboidratos (VAN DAMME et al., 1998).

Tendo em vista a vasta aplicabilidade das lectinas, Potapov, no ano de 1968, fez referência do termo lectinologia. Este termo, atualmente, vem sendo bastante difundido no sentido de limitar a área de conhecimento que se ocupa do estudo das lectinas. Entretanto, o termo lectina, do latim *legere*, foi proposto, em 1954, por Boyd e Sharpleigh enfatizando, a propriedade de algumas proteínas aglutinarem seletivamente distintos tipos celulares, uma vez que o termo significa escolher, selecionar (VAN DAMME et al., 1998; ZATTA & CUMMINGS, 1992).

Em 1980, as lectinas foram consideradas por Goldestein e colaboradores como proteínas de origem não-imune que se ligam a carboidratos, capazes de aglutinar células e /ou precipitar glicoconjugados. O termo lectina é aplicado para descrever uma classe de proteínas estruturalmente muito diversa, que não são enzimas nem anticorpos, caracterizadas pela sua habilidade em ligar a carboidratos específicos (RINI, 1995; VIJAYAN & CHANDRA, 1999).

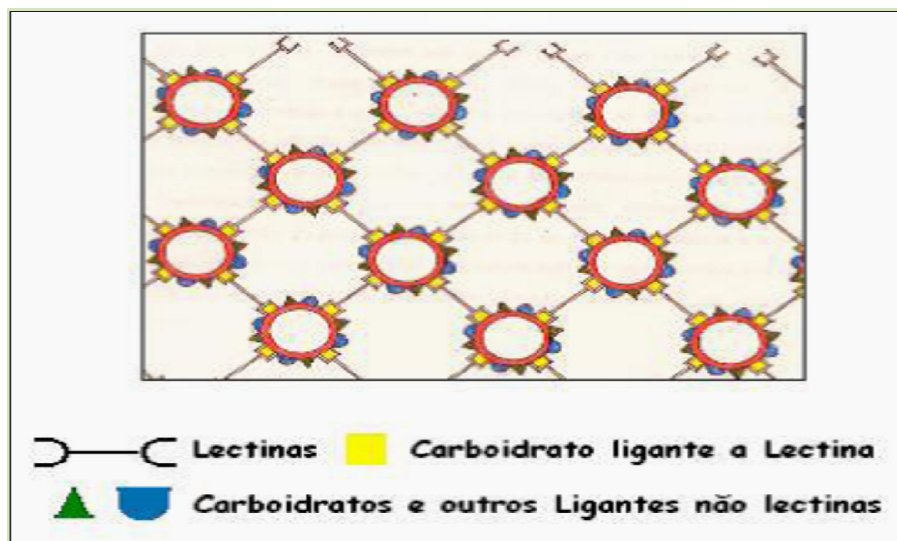
Peumans e Van Damme estabeleceram na metade da década de 90 do século passado que lectinas são proteínas ou glico-proteínas de origem não-imune capazes de ligarem-se

específica e reversivelmente a carboidratos, possuindo pelo menos um domínio não-catalítico (PEUMANS & VANDAMME, 1995).

3.1.2 Detecção

A presença de lectinas em uma amostra pode ser facilmente detectada a partir de ensaios de aglutinação (**Figura 1**), nos quais elas interagem com carboidratos da superfície celular através de seus sítios, formando diversas ligações reversíveis entre células opostas. As lectinas podem aglutinar diversos tipos de células. O ensaio mais comumente utilizado é o de hemaglutinação, o qual é realizado através de uma diluição seriada da amostra contendo lectina e de posterior incubação com eritrócitos; a rede formada entre os eritrócitos constitui o fenômeno de hemaglutinação. O inverso da maior diluição em que se observa a hemaglutinação corresponde à atividade hemaglutinante (SANTOS et al., 2005).

Figura 1. Esquema da aglutinação por lectinas. (Adaptação Kennedy et al., 1995).



Algumas lectinas são classificadas como metaloproteínas, pois necessitam de cátions como Ca^{2+} e Mn^{2+} para realizar a sua atividade hemaglutinante, sendo que estes íons estão associados a uma série de aminoácidos conservados que participam da ligação ao carboidrato (MURDOCK & SHADE, 2002).

O vasto emprego do ensaio de hemaglutinação deve-se à facilidade de obtenção dos eritrócitos do tecido sanguíneo e à riqueza qualitativa dos resíduos sacarídicos que são expressos em suas superfícies (BUTERA & SOUZA-FILHO, 2007).

A capacidade de aglutinar células, isoladamente, não é propriedade particular de uma lectina, pois outros agentes, como taninos, certos lipídeos e cátions divalentes em altas concentrações também são capazes de produzir esse tipo de reação. Para garantir que a aglutinação esteja sendo mediada pela lectina exige-se que aconteça a inibição desta atividade por carboidratos (RUDIGER, 1998).

Os eritrócitos usados podem ser de humanos ou de animais, os quais podem ser tratados enzimaticamente (com tripsina, papaína, entre outras) ou quimicamente (com glutaraldeído ou formaldeído). Como efeito dos tratamentos pode ocorrer aumento do reconhecimento das células por lectina (COELHO & SILVA, 2000).

3.1.3 Ocorrência

As lectinas são encontradas amplamente em animais invertebrados (molusco, crustáceos, protozoários, esponjas), em animais vertebrados (peixes, répteis, aves, mamíferos e no seres humanos), plantas, algas, fungos, microrganismos (bactérias e vírus) (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; CAVADA et al., 1998). Entretanto essas substâncias estão presentes em maior quantidade em sementes de leguminosas e gramíneas (LORIS, 2002; CAVADA et al., 1998).

Lectinas vegetais apresentam-se distribuídas em muitos grupos botânicos, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas, musgos e líquens, mas são muito mais frequentemente encontradas em Leguminosae e Euphorbiaceae. Elas podem existir em vários tecidos da mesma planta e têm diferentes localizações celulares e propriedades moleculares. As lectinas são mais abundantes nas sementes, porém podem facilmente ser encontradas em partes vegetativas. Em sementes de leguminosas estão prevalentemente nos tecidos cotiledonares (PUSZTAI, 1991). Dentre as monocotiledôneas, a família Cannaceae constituída apenas pelo gênero *Canna* com, aproximadamente, 50 espécies distribuídas pelas regiões tropicais do mundo (ALONSO et al., 2004), é um exemplo de fonte de lectinas.

Nos mamíferos estão em plaquetas, células endoteliais, macrófagos, fibroblastos, espermatozóides, linfócitos, células normais ou transformadas, fígado, baço e tecido nervoso (LORIS, 2002; SHARON & LIS, 2004).

3.1.4 Classificação

Atualmente, as lectinas vegetais são classificadas basicamente em três sistemas. Estes sistemas estão fundamentados na especificidade aos carboidratos, em famílias evolutivamente relacionadas e nas semelhanças estruturais das moléculas.

As diferentes maneiras de classificação das lectinas abordam aspectos distintos, logo é importante empregá-las de maneira complementar e conjunta.

3.1.4.1 Classificação Quanto Especificidade a Carboidratos

É uma classificação baseada na afinidade das lectinas por carboidratos. Van Damme e colaboradores (1998) propuseram uma classificação mais abrangente com seis grupos de lectinas vegetais, conforme a **Tabela 1**.

Tabela 1. Especificidade de ligação das lectinas vegetais a carboidratos, conforme VAN DAMME et al., 1998.

Grupo	Especificidade ao Carboidrato	Exemplos
Fucose	L- fucose	Lectina de <i>Ulex europaeus</i>
Galactose/N-acetil-galactosamina	Galactose>Neu5Ac α (2,6)Gal/GalNAc	Lectina de <i>Artocarpus integrifolia</i> (Jacalina)
	Galactose=Neu5Ac α (2,6)Gal/GalNAc	Lectina de <i>Clerodendron trichotomum</i>
	Galactose>Neu5Ac α (2,6)Gal/GalNAc	Lectina de <i>Glycine max</i> L. Merrill (SBA)
N-acetil-D-glicosamina	N-Acetil-D-glicosamina (GlcNAc)	Lectina de <i>Triticum vulgare</i> L. (WGA)
		Lectina de <i>Urtica dioica</i> (UDA)
Manose	Manose	Lectina de <i>Galanthus nivalis</i> (GNA)
	Manose/Glicose	Lectina de <i>Concavalina A</i> (ConA)
	Manose/Maltose	Lectina de <i>Calystegi sepium</i>

Continua

Tabela 1. Continuação

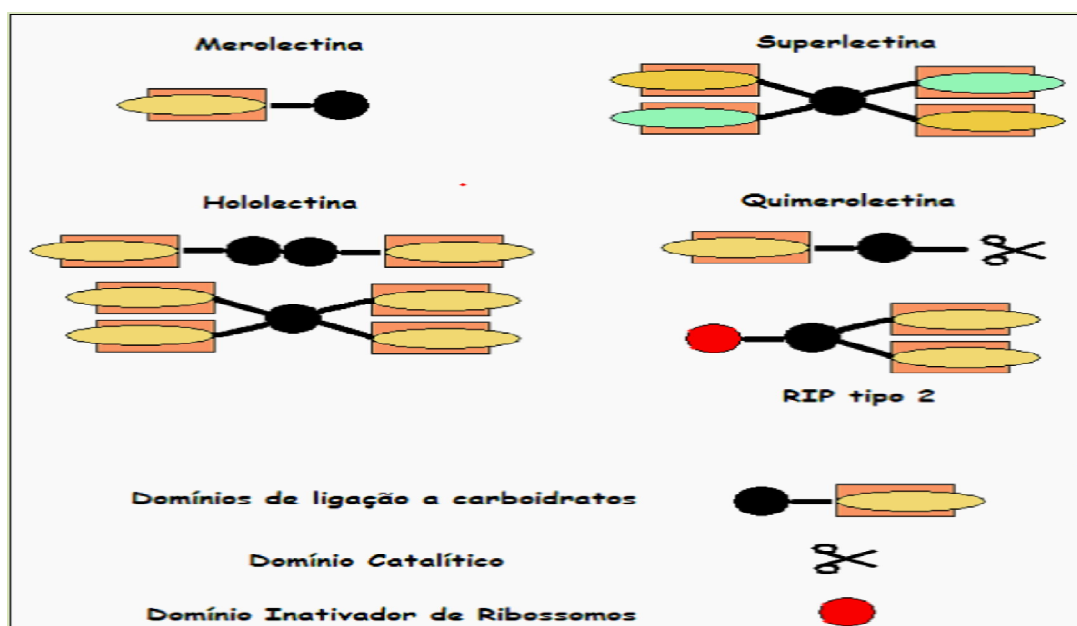
Grupo	Especificidade ao Carboidrato	Exemplos
Ácido Siálico	Ácido Siálico	Lectina de <i>Limax flavus</i>
	Neu5Ac α (2,6)Gal/GalNAc	Lectina de <i>Sambucus nigra</i>
	Neu5Ac α (2,3)Gal/GalNAc	Lectina de <i>Maackia nigra</i>
Grupo de Glicanos Complexos	Complexos Conhecidos	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA)
	Complexos Desconhecidos	Lectina de <i>Euonymus europaeus</i>

3.1.4.2 Classificação Estrutural

A classificação estrutural das lectinas as subdivide em quatro classes: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (**Figura 2**).

Figura 2. Subdivisão de lectinas de plantas de acordo com a característica estrutural.

(Adaptação de Van Damme et al., 1998).



As merolectinas são proteínas que possuem um único domínio de ligação a carboidrato, têm massa molecular baixo e, sendo monovalentes, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinarem células. São consideradas, estruturalmente, as mais simples. Ex.: heveína proteína do látex ligante de quitina (*Hevea brasiliensis*) e algumas lectinas de orquídeas (VAN DAMME et al., 1998; PEUMANS et al., 2001).

As hololectinas são divalentes ou multivalentes e, portanto aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. São geralmente proteínas oligoméricas, sendo a maior parte das lectinas de plantas pertencentes a esse grupo. Ex.: *Concavalina A* (ConA) (VAN DAMME et al., 1998).

As quimerolectinas são proteínas que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos ligados a um domínio não-relacionado. Esse domínio pode ter uma atividade enzimática bem-definida ou qualquer outra atividade biológica que atue independentemente do sítio de ligação a carboidrato. Neste grupo geralmente são encontrados proteínas com dupla função, mas que são complementares entre si, como por exemplo, proteínas relacionadas com invasividade celular, as quais utilizam o domínio de reconhecimento a açúcar como ponto para ancoragem e, subsequentemente, agem com o outro domínio para efetivar a entrada ou até mesmo a destruição de membranas (VAN DAMME et al., 1998). Exemplos: A lectina ricina, uma proteína citotóxica inativadora de ribossomo tipo 2 e as lectinas isoladas de *Vigna radiata* e *Vicia faba* que possuem, além de um domínio catalítico com atividade de glicosidas e capaz de clivar glicosídeos, um domínio ligante de galactose e glicose-manose, respectivamente (PUSZTAI, 1991).

As superlectinas consistem exclusivamente de pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos e diferem das hololectinas por serem consideradas como um grupo particular de quimerolectinas compostas de duas estruturas arrumadas sequencialmente com sítios de ligação a carboidratos funcionalmente diferentes (VAN DAMME et al., 1998). Exemplos: frutalina - lectina de sementes de *Artocarpus incisa* (MOREIRA et al., 1998), que se ligam tanto a D-galactose como a D-manose e lectina isolada de bulbo de tulipa, que se ligam tanto a manose como a N-acetilgalactosamina (PENEUMANS et al., 2001).

3.1.4.3 Classificação em Família Evolutivamente Relacionada

As lectinas de plantas são classificadas em sete grupos de acordo com as semelhanças estruturais e evolutivas. Esses grupos são nomeados de lectinas de leguminosas, lectinas ligantes à quitina, lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose, proteínas inativadoras de

ribossomo tipo 2, lectinas de floema de Cucurbitaceae, família da Jacalina e das Amaranthaceae (VAN DAMME et al., 1998).

As lectinas de leguminosas têm como principal representante a lectina isolada de sementes de *Canavalia ensiformis* (Con A) e frequentemente consistem de 2 ou 4 subunidades de 25-30 kDa, e cada subunidade apresenta um sítio de ligação a carboidrato (CAVADA et al., 1998). Elas são estruturalmente relacionadas e requerem cátions divalentes em sítios ligantes a metal. Cada subunidade possui um íon Ca^{2+} e Mn^{2+} , que são fundamentais para a atividade de ligação a carboidrato da lectina (VAN DAMME et al., 1998). As lectinas de leguminosas são consideradas um modelo de estudos das bases moleculares das interações proteína-carboidrato devido a sua especificidade de ligação e facilidade de obtenção e purificação (LORIS et al., 2004).

As lectinas ligantes à quitina (unidades de *N*-acetil-glicosamina) contêm o chamado domínio heveína. A heveína é constituída por 43 resíduos de aminoácidos, encontrada no látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*). Ela é rica em resíduos de glicina e cisteína, e sua estrutura é mantida por 4 pontes dissulfeto, o que lhe confere uma maior estabilidade (NEWMAN et al., 2004). Estas lectinas estão presentes em Gramineae, Solanaceae, Urticaceae, Papaveraceae, Amaranthaceae e Poáceas (MARTINEZ-CRUZ et al., 2001). As quitinases classe I, por exemplo, são quimerolectinas compostas de um único domínio heveína ligado a um domínio catalítico com atividade quitinásica (COLLINGE et al., 1993).

As lectinas monocotiledôneas ligantes à manose foram descritas nas famílias das amarilidáceas, aliáceas, aráceas, liliáceas, bromeliáceas e orchidáceas, além de aloáceas. Nestas famílias, as lectinas apresentam estrutura tridimensional e sequência de aminoácidos com alto grau de semelhança (VAN DAMME et al., 1998).

As lectinas inativadoras de ribossomo tipo 2 são quimerolectinas com uma cadeia A, cataliticamente ativa, ligada covalentemente por pontes de dissulfeto a uma cadeia B. Ambas as cadeias são sintetizadas por uma única molécula precursora a qual é pós-transducionalmente processada através da excisão de uma ligação entre as cadeias A e B (VAN DAMME et al., 1998; STIRPE & BATTELLI, 2006). A cadeia A penetra por endocitose nas células e a cadeia B complexa com glicorreceptores de superfície celular. Em geral, estas lectinas impossibilitam a síntese protéica, promovendo a morte celular pela remoção de resíduos de adenina do rRNA (AGAPOV et al., 1999).

Nas Curcubitaceae, normalmente as lectinas são glicosiladas e apresentam um domínio específico, principalmente para quitina. Todas as lectinas conhecidas do floema de Curcubitaceae mostram um grau de semelhança sequencial entre si, porém não tem qualquer

semelhança sequencial com outras lectinas ou proteínas de plantas. Estas lectinas compõem um grupo particularizado, uma vez que apesar de apresentem especificidade para quitina não mostram o domínio heveína, característico para as outras lectinas com especificidade a quitina (VAN DAMME et al., 1998).

As lectinas da família da jacalina estão estruturalmente e evolutivamente relacionadas à família das moráceas ou convolvuláceas, formando dois subgrupos. As lectinas de moráceas são específicas para *N*-acetil-*D*-galactosamina, enquanto que as de convolvuláceas são manose/maltose específica (VAN DAMME et al., 1998).

Nas amarantáceas as lectinas apresentam uma sequência de aminoácidos similar entre si, massa molecular de 33kDa. Estas são homodimérica e não são glicosiladas, além de serem específicas para *N*-acetil-*D*-galactosamina (VAN DAMME et al., 1998).

Esta classificação das lectinas em diferentes famílias é baseada na similaridade sequencial e no relacionamento estrutural entre as lectinas. Não podemos excluir que pouquíssimas lectinas ainda não classificadas pertencem a famílias de proteínas diferentes e com isso é bem possível que novas famílias de lectinas sejam descobertas no futuro (VAN DAMME et al., 2004).

3.1.4.3.1 Lectinas de Monocotiledôneas Ligantes à Manose

As lectinas de monocotiledôneas ligante à manose têm atraído interesse por causa das suas propriedades moleculares e biológicas. Estas lectinas consistem em sequência altamente homóloga e de semelhanças na estrutura terciária, sugerindo que essas proteínas compõem uma única família de lectinas ligadora à manose (BHAT et al., 2010).

Embora todas as lectinas de monocotiledôneas sejam muito semelhantes há diferenças significativas dessas proteínas no processamento co e/ou pós-traducionais. Em geral essas proteínas são dímeros ou tetrâmeros contendo subunidades de 12 - 14 kDa (VAN DAMME et al., 2007).

Foram evidenciadas propriedades inseticida (BALZARINI et al., 1992; GATEHOUSE et al., 1990), antivirais (BALZARINI et al., 1992; GATEHOUSE et al., 1990; SWANSON et al., 2010) e atividade nematocida (BHAT et al., 2010); além de efeitos sobre as células tumorais (BROWN et al., 2005; LIU et al., 2009) e apoptose (LIU et al., 2009).

3.1.5 Especificidade por Carboidratos

Os carboidratos agem como mediadores na comunicação celular em diversos sistemas biológicos, podendo assim, influenciar diversos fenômenos de diferenciação, proliferação e interações entre células em condições fisiológicas e patológicas. As informações presentes na estrutura dos oligossacarídeos conjugados a lipídeos ou proteínas na superfície das células são reconhecidas por um grupo de proteínas, denominadas de lectinas (SANZ-APARÍCIO et al., 1997).

A interação de lectinas com os carboidratos é bastante específica, tanto quanto a interação entre uma enzima e seu substrato, ou antígenos com anticorpos. As lectinas podem ligar-se a açúcares livres ou polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos que podem estar livres ou associados a membranas (PUSZTAI, 1991). Alguns aspectos importantes têm sido descritos com respeito a essa especificidade, que são: as lectinas de plantas exibem uma ampla gama de interações; a maioria das lectinas tem mais afinidade por oligossacarídeos do que por açúcares simples; lectinas estruturalmente diferentes podem reconhecer os mesmos açúcares; a especificidade de muitas lectinas ocorre com glicanos não originados de plantas (PEUMANS et al., 1998).

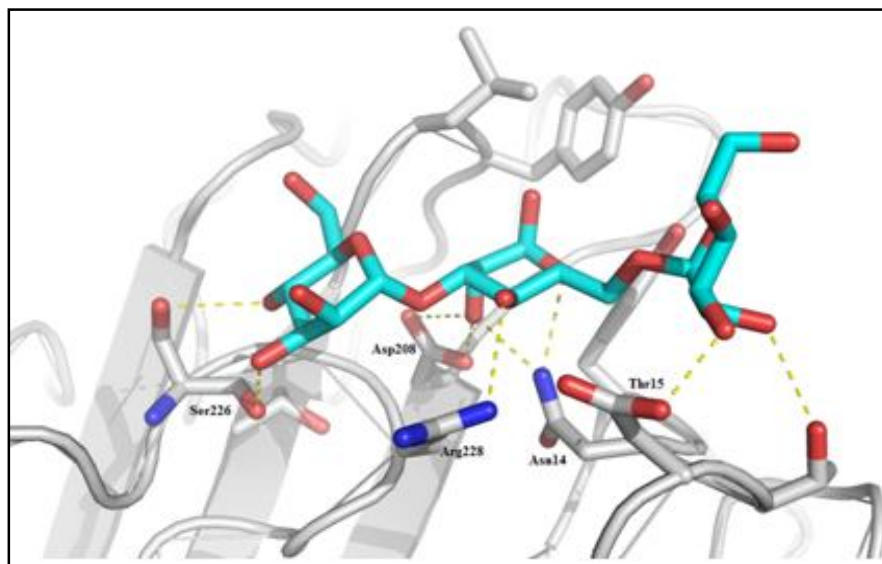
As lectinas fazem uso de uma série de diversas interações químicas fracas para produzir reconhecimento altamente seletivo a seus carboidratos ligados a uma superfície. Esta interação fraca entre a lectina e o carboidrato aumenta tanto a afinidade como a especificidade através de subsítios e subunidades. Esta ligação ao carboidrato é diretamente responsável pela atividade biológica (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

As lectinas se ligam a carboidratos através de redes de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (AMBROSI et al., 2005). Forças de Van der Waals embora sejam fracas, frequentemente são numerosas, contribuindo para a ligação global (LIS & SHARON, 1998). A disposição estérica do grupo hidroxila nos carboidratos cria caminhos hidrofóbicos na superfície do açúcar que pode interagir com as regiões hidrofóbicas da proteína (DAVIS, 1999; RINI, 2005).

A formação do complexo carboidrato-proteína acontece por meio de ligações não covalentes, envolvendo o deslocamento de uma molécula de água associada ao grupo polar da proteína e as ligações que estão em torno do carboidrato altamente polar, resultando na formação de novas pontes de hidrogênio, que juntamente com as forças de Van der Waals estabilizam esta complexação (KENNEDY et al., 1995; WEIS & DRICKANER, 1996) (**Figura 3**). A água age como uma molécula redutora, sua pequena dimensão e sua habilidade

fazem com que ela se comporte como um doador de hidrogênio e receptor fazendo uma aproximação para esta função. A ligação firme da molécula da água pode de fato ser considerado como estrutural, ou seja, uma extensão da superfície de proteínas. Assim, a molécula da água desempenha um papel importante no reconhecimento de carboidrato, dando em alguns casos extraordinária especificidade (AMBROSI et al., 2005).

Figura 3. Representação por Doking da ligação da lectina a um carboidrato (A). As linhas pontilhadas representam pontes de hidrogênio. PDB: 3A0K.



Alguns grupos de lectinas são excelentes ferramentas para o estudo das relações estrutura/função. A propriedade peculiar de reconhecer e ligar-se especificamente a carboidratos tem tornado estas proteínas um excelente meio de diagnóstico na pesquisa médica em estudos bioquímicos e imunoquímicos (KENNEDY et al., 1995; SHARON & LIS, 2003).

3.1.6 Função e Papel Fisiológico

Nas plantas as lectinas são úteis na proteção contra fitopatógenos e predadores, mediadores de simbiose, na manutenção da dormência das sementes, transporte de carboidratos, proteínas de armazenamento, alongação da parede celular, estimulação mitogênica de células embrionárias, reconhecimento do pólen, função de crescimento e

desenvolvimento da planta controlado hormonalmente (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; RUDIGER & GABIUS, 2001; LORIS, 2002; KOMATH et al., 2006).

Delatorre e colaboradores (2007) propõem que as lectinas de plantas além de reconhecer carboidratos simples, podem interagir com metabólitos secundários, exibir reconhecimento celular e desempenhar funções de defesa na fisiologia vegetal.

Tanto a especificidade quanto os efeitos deletérios das lectinas de plantas a insetos e/ou a animais superiores indicam que elas desempenham um papel de proteção, de modo que a reação de fuga desses predadores possa ser benéfica para a sobrevivência das espécies (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Ainda que o modo exato da ação inseticida das lectinas de plantas não esteja completamente elucidado, parece que a resistência à degradação proteolítica pelas enzimas digestivas do inseto e a ligação às estruturas do intestino do inseto sejam os dois pré-requisitos básicos para as lectinas exercerem seus efeitos deletérios nos insetos. Como nos sistemas de animais superiores, os efeitos nocivos das lectinas nos insetos são atribuídos principalmente à ligação destas à superfície das células epiteliais do intestino que induz interferências nas funções digestivas, protetoras ou secretórias do intestino (PUSZTAI, 1996).

Nos microrganismos, as lectinas fariam a ligação com a célula hospedeira e atuariam como determinantes de reconhecimento em processos imunológicos, fagocitose e adesão celular (PONCHEL & IRACHE, 1998).

Em animais, evidências sugerem que lectinas participem do mecanismo de endocitose e transporte vetorial intracelular de glicoproteínas, apoptose, defesa contra patógenos, na regulação da migração e adesão celular, na ligação de bactérias às células epiteliais e de que as lectinas funcionem como um tipo de receptor (KILPATRICK, 2002; PONCHEL & IRACHE, 1998).

3.1.7 Atividade Biológica

As diferenças na estrutura quaternária na molécula podem ser responsáveis pelas distintas atividades biológicas apresentadas pelas lectinas altamente homólogas (SANZ-APARÍCIO et al., 1997; GADELHA et al., 2005). Diferenças na sequência e/ou montagem da estrutura quaternária das lectinas explicam as diferenças biológicas *in vivo* e *in vitro* (ROCHA et al., 2011).

Algumas atividades biológicas das lectina já foram constatadas como a aglutinação de células, estimulação de leucócitos humanos a produzir interferon e outras interleucinas,

identificação dos grupos sanguíneos, ação mitogênica em linfócitos, ação citotóxica, ação antioxidante, ação inflamatória, ação anti-inflamatória, atividade antibacteriana, atividade inseticida, atividade cicatrizante, adesão celular, inibição do crescimento de fungos, entre outras (PENEUMAS & VAN DAMME, 1995; RUDIGER & GABIUS, 2001 e LORIS, 2002). Determinadas lectinas podem induzir apoptose em vários tipos de células, o qual pode ajudar a explicar sua toxicidade (PARK et al., 2000).

Dependendo da via de administração utilizada as lectinas podem provocar efeitos pró-inflamatórios e imunoestimulantes ou efeitos anti-inflamatórios. Quando as lectinas são administradas localmente seu efeito pró-inflamatório e imunoestimulante é evidenciado (BARRAL-NETO et al., 1992; GOMES et al., 1994; ALENCAR et al., 2003, 2004; MACIEL et al., 2004; ROCHA et al., 2011), já quando administradas pela via oral ou pela via intravenosa seu efeito, em geral, é anti-inflamatório (ASSREUY et al., 1997, 1999; ALENCAR et al., 1999, 2005; MOTA et al., 2006; SANTI-GADELHA et al., 2006; NAPIMOGA et al., 2007).

Determinadas lectinas de plantas podem mimetizar as lectinas endógenas de mamíferos e induzir a migração de neutrófilos e células mononucleares *in vivo* e *in vitro* (BENTO et al., 1993). Foi evidenciado que a lectina de soja também pode induzir a migração de neutrófilos e de linfócitos *in vivo* e ativar as células (BENJAMIN et al., 1997). Outros exemplos de indução foram demonstrados com lectinas isoladas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora*, onde foi observada a exsudação de proteína além da migração de neutrófilos em ratos, de modo dose-dependente (BENTO et al., 1993).

Muitas atividades inflamatórias atribuídas as lectinas são decorrentes dos mecanismos de quimioatração, da produção e secreção de citocinas pelos leucócitos ativados e da estimulação policlonal de linfócitos (SELL & COSTA, 2002).

A descoberta das selectinas evidenciou que elas desempenham uma ação determinante no retorno de linfócitos a órgãos linfóides e no transporte de leucócitos (neutrófilos e monócitos) para os sítios de inflamação por meio de interação lectina-carboidrato. E-selectina e P-selectina são as lectinas presentes na membrana celular do endotélio vascular e que funcionam como receptores de adesão celular. Elas intercedem na ligação de leucócitos as células endoteliais culminando com a diapedese através da participação de outras moléculas de adesão como as integrinas, e da secreção de citocinas e outras substâncias quimioatraentes. A prevenção de reações inflamatórias adversas por inibição da interação endotélio-leucócito, como uma terapia antiadesão, é o maior objetivo da indústria farmacêutica. Há evidências que as selectinas possam funcionar como disseminadoras de células cancerosas do tumor central

para outros sítios no organismo e que o bloqueio de sua ligação ao sítio de carboidrato poderia impedir a formação de metástase. Várias lectinas nas células vegetais e animais mimetizam a ação biológica das selectinas por induzirem a migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo* (VAN DAMME et al., 2004; GALEGO DEL SOL et al., 2006).

Os efeitos anti-inflamatórios provocados pelas lectinas exógenas devem ocorrer devido ao bloqueio dos sítios glicosilados das selectinas na membrana dos leucócitos e/ou nas células endoteliais (ASSEREUY et al., 1999; ROCHA et al., 2011). Várias lectinas endógenas são reconhecidas entre as moléculas de adesão que participam ativamente nas respostas inflamatórias, tais como as selectinas (L-, P- e E- selectina) (BEVILACQUA & NELSON, 1993).

Desta forma, as lectinas representam alvos moleculares no combate de agentes patogênicos. Assim estas proteínas são úteis como modelos para estudos de quimiotaxia, ou então para geração de fármacos no tratamento de inflamação devido a microrganismo patogênico, e problemas, como por exemplo, psoríase, artrite reumatóide, gripe e asma (KENNEDY et al., 1995).

Muitas destas atividades biológicas estão relacionadas à interação da lectina com açúcares presentes nas superfícies celulares. A constatação da participação do domínio lectínico nos diferentes processos de reconhecimento celular é possível pela inibição do efeito da lectina através da ligação da mesma ao seu açúcar/glicoconjugado específico, por transformação química dos carboidratos de superfície celulares, ou pelo uso de células mutantes (YUEN et al., 2003). Todavia, lectinas podem apresentar outros sítios ligantes específicos para moléculas de natureza não glicídica.

3.1.8 Purificação

Na purificação de lectinas diversas técnicas podem ser empregadas. O processo de purificação de uma lectina consiste no fracionamento por “salting out” de um extrato salino ou em solução tampão, com o objetivo de precipitar a proteína (BASZKIN et al., 2000). Outras técnicas podem ser empregadas no processo de purificação. As lectinas podem ser purificadas através de cromatografia por afinidade (BELITZ & WEDER, 1990), através de membranas de afinidade em matriz de celulose modificada (BOI et al., 2006), através de cromatografia de troca iônica e gel de filtração (ZENTENO et al., 2000; RATANAPO et al., 2001; REGO et al., 2002; YAN et al., 2005). Contudo, a habilidade das lectinas de ligarem a carboidratos de forma específica e reversível permite o seu uso não só para isolamento e

caracterização de compostos contendo carboidratos, para o fracionamento celular, mas inclusive à sua purificação (BELITZ & WEDER, 1990) contendo suportes polissacarídeos (COELHO & SILVA, 2002) ou com glicoproteínas imobilizadas (KAUR et al., 2005).

Os três maiores tipos de adsorventes bioespecíficos descritos para purificação de lectinas por cromatografia de afinidade são: polissacarídeos, nativos ou modificados; glicoproteínas ou glicopeptídeos ligados a uma matriz insolúvel e ainda monossacarídeo ou dissacarídeo ligados a uma matriz, sendo estes últimos os mais abundantes (LIS & SHARON, 1981).

O fracionamento de proteínas por meio de cromatografia tem sido praticado desde a década de 1970 (PIZON et al., 2008). Desde que lectinas têm propriedade de ligação a carboidratos, colunas contendo suportes polissacarídicos como Sephadex (polímero de glicose), Sepharose (polímero de galactose) e quitina (polímero de *N*-acetil glicosamina), têm sido usadas (CAVADA et al., 1998; ANURADHA et al., 1999; JIMBO et al., 2000). A cromatografia por afinidade, utilizada para proteínas, explora as interações entre as proteínas e os ligantes estacionários para realizar a purificação (PIZON et al., 2008).

A cromatografia de afinidade para isolamento de lectina tem como base de separação a propriedade da proteína se ligar especificamente a matrizes polissacarídicas através de ligações não covalentes. Matrizes são construídas pela incorporação, a um suporte insolúvel, de um ligante, pelo qual a proteína de interesse tenha afinidade (SUN et al., 2007).

A proteína de interesse é obtida com alto grau de pureza, alterando-se as condições de pH, força iônica ou pela eluição com uma solução contendo um competidor (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

A facilidade na purificação contrasta com a dificuldade na delimitação das funções dessas lectinas. Com relação à isoformas, ou seja, as isolectinas outras etapas de caracterização físico-química são necessárias (GABIUS, 1994).

3.1.9 Aplicação

A versatilidade evidenciada pelas lectinas estimula a exploração do seu potencial em diversas pesquisas médicas e bioquímicas (MELLO-JÚNIOR et al., 2006). Elas podem ser aplicadas como instrumento em várias áreas, como por exemplo, pesquisas sobre câncer, imunologia, estudos básicos de bioquímica e estruturas de membranas, purificação de glicoproteínas, identificação celular e histológica (ZATTA & CUMMINGS, 1992).

De acordo com Sharon & Lis (2004) as maiores aplicações de lectinas estão relacionadas na **Tabela 2**

Tabela 2. Aplicações de lectinas, conforme SHARON & LIS, 2004.

Aplicações
Identificação e separação celular;
Detecção, isolamento e estudos estruturais de glicoproteínas;
Investigação de carboidratos em superfície celular e organelas subcelular; histoquímica e citoquímica;
Mapeamentos de caminhos neuronais;
Estimulação mutagênica de linfócitos em uso clínico;
Purificação de medula óssea para transplantes em uso clínico;
Seleção de lectinas resistente à mutação;
Estudo de biossíntese de glicoproteína;
Liberação controlada de drogas.

A aplicação futura de lectinas para vetorização de fármacos de difícil absorção a sítios específicos no organismo humano representa um grande potencial para tratamento futuro de doenças (WOODLEY, 2000).

Devido ao grande número de espécies vegetais apresentando propriedades anti-inflamatórias, as lectinas têm um amplo potencial para o desenvolvimento de fármacos, com ação anti-inflamatória que possam ter utilização na saúde humana (MAZUMBER et al., 2003).

3.2 Classificação Botânica da Espécie *Canna limbata* Roscoe

Dentre as monocotiledôneas, a ordem Zingiberales é claramente delimitada e aceita como grupo natural de oito famílias: Zingiberaceae, Costaceae, Marantaceae, Cannaceae, Lowiaceae, Musaceae, Heliconiaceae e Strelitziaceae. Essas famílias incluem 89 gêneros e cerca de 1.800 espécies, sendo a família Cannaceae constituída apenas pelo gênero *Canna* com, aproximadamente, 50 espécies distribuídas pelas regiões tropicais do mundo (ALONSO et al., 2004).

As características mais acentuadas, facilmente reconhecidas e evidenciadas nas Zingiberales são: folhas grandes, de lâminas com venação transversa e, frequentemente, longo

pecioladas; inflorescências grandes, com brácteas frequentemente coloridas (BERRY & KRESS, 1991).

De modo geral, as Zingiberales são plantas herbáceas rizomatosas, perenes, pequenas a arborescentes, a maioria terrestre, típicas de habitat tropical e úmido. As folhas comumente são pecioladas, na maioria das vezes com uma bainha fechada, algumas vezes liguladas, lâminas foliares inteiras com muitas veias laterais que se bifurcam de uma nervura central. Metade da lâmina foliar envolvida pela outra metade na gema. Inflorescência terminal ou lateral, frequentemente com brácteas grandes, côncavas e espatiformes com cores variadas e com brilho. As flores normalmente são perfeitas zigomorfas ou assimétricas, três sépalas, três pétalas frequentemente desiguais. Androceu, a mais visível porção da flor, arranjada em dois ciclos trímeros; estames perfeitos, um fértil (5 ou 6), quando com um, a flor com estaminódios bem visíveis, estes diversos em número, forma, arranjo e fusões, normalmente mais vistosos que o perianto. Gineceu tricarpelar, sincarpo e basicamente trilocular (dois lóculos algumas vezes abortam), com vários óvulos por lóculo; ovário ínfero, estilo simples. Sementes com abundante endosperma, frequentemente com um arilo. A transformação de estames em estaminódios estéreis é uma característica bem conhecida nas famílias da ordem Zingiberales (CASTRO, 1995).

As plantas da família Cannaceae são perenes, rizomatosas, caules aéreos, com folhas verdes distribuídas ao longo do tronco, flores assimétricas. Esta família é originalmente neotropical (MAAS et al., 2008).

O nome do gênero é proveniente do latim (“*canna*” = cana), devido à semelhança do caule aéreo de suas espécies com os colmos de cana. De acordo com Dahlgren e colaboradores (1985) as espécies do gênero *Canna* possuem hábito rizomatoso, apresentando rizoma horizontal e ramificado, com a emissão de caule aéreo ereto, folhas e inflorescência terminal. A utilização do termo “rizomatoso” deve-se à diversidade dos padrões de arquitetura do rizoma (ALONSO & MORAES-DALLAQUA, 2004). As espécies desse gênero são herbáceas e, pelo caráter decorativo de suas flores, são cultivadas como plantas ornamentais (ALONSO et al., 2004).

A *Canna limbata* Roscoe (**Figura 4**) é uma planta de origem brasileira, mais conhecida como beri-silvestre, biri-silvestre ou bananeirinha. Esta é uma herbácea rizomatoso, entouceirada, perene, de 0,9 a 1,2 m de altura. Apresenta folhas grandes, brilhantes e persistentes. As inflorescências são terminais com flores vermelhas de base amarelada, formadas na primavera-verão (RIBEIRO & PAIVA, 2011).

Figura 4. *Canna limbata* Roscoe.



Fonte: <http://www.floresnaweb.com/dicionario.php?id=217> (12/11/2010).

3.3 Resposta Inflamatória

A inflamação é uma resposta do tecido vivo e vascularizado à lesão local. Essa resposta é desencadeada por infecções microbianas, agentes físicos, substâncias químicas, tecidos necróticos ou reações imunológicas. A inflamação deve conter e isolar a lesão, destruir os microrganismos invasores e as toxinas inativas e preparar o tecido para o reparo. Mesmo sendo necessariamente um mecanismo de defesa, a inflamação pode ser prejudicial, por reações de hipersensibilidade potencialmente fatais ou lesionar o órgão de maneira progressiva e permanente com uma inflamação crônica e fibrose subsequente (MITCHELL et al., 2006; ROBBINS & COTRAN, 2005).

Essas respostas de defesa do hospedeiro são controladas ou moduladas por um grande número de mediadores químicos, extravasamento de líquidos, migração celular, lesão tecidual e reparação (VANE & BOTTING, 1996; RANG et al., 2007). A inflamação só acaba quando o agente agressor for eliminado e os mediadores secretados inativados (MITCHELL et al., 2006).

A inflamação pode ser dividida em duas fases: aguda e crônica. A inflamação aguda é de duração relativamente curta, podendo durar minutos, horas ou mesmo alguns dias. Sua principal característica é a presença de exsudato rico em proteínas plasmáticas e a migração de leucócitos, principalmente os neutrófilos. Já a inflamação crônica tem duração mais longa e está relacionada com algumas alterações histológicas, como a presença de linfócitos e

macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (COLLINS, 2000; RANG et al., 2007).

A resposta inflamatória é caracterizada, a nível clínico, por quatro sinais clássicos, que incluem calor, rubor (eritema), tumor (edema) e dor. Porém, uma resposta inflamatória exacerbada pode promover uma descompensação fisiológica, levando a perda de função do tecido e/ou órgão (**Figura 5**) (RANG et al., 2007).

Figura 5. Sinais clínicos da inflamação.



Fonte: dol.inf.br/Html/CompreendendoDor (12/12/2010).

Durante o processo inflamatório ocorrem dois eventos simultâneos que compreendem eventos vasculares e eventos celulares.

3.3.1 Eventos Vasculares

Os eventos vasculares associados à resposta inflamatória têm como função a eliminação de substâncias tóxicas geradas no local, além de facilitar a chegada de células inflamatórias que atraídas pelos mediadores quimiotáticos, fagocitam (neutrófilos e macrófagos) e/ou liberam substâncias citotóxicas, presentes em grânulos, contribuindo para a destruição do agente lesivo (SCHOR, BOIM & SANTOS, 2003).

As alterações vasculares iniciam-se imediatamente e desenvolvem-se durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório e, consistem em vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma. Esses eventos têm como principal função facilitar o acesso ao sítio inflamatório pelos mediadores plasmáticos e células sanguíneas, sendo fundamental para a defesa do organismo (SIANI et al., 2000).

Os eventos vasculares da resposta inflamatória compreendem alterações hemodinâmicas, que culminam para o extravasamento de proteínas plasmáticas para tecido adjacente (RANKIN, 2004).

As alterações vasculares ou hemodinâmicas ocorrem através de constrição momentânea dos pequenos vasos da região. A vasoconstrição é acompanhada imediatamente pela vasodilatação das arteríolas e vênulas que suprem a área. Como consequência, a área torna-se congesta causando o rubor (eritema) e calor associado com a inflamação aguda. Estas respostas de hiperemia são acompanhadas do aumento da permeabilidade capilar, permitindo que os fluidos escapem para dentro dos tecidos, causando inchaço (edema). A dor e a incapacidade funcional seguem-se em decorrência do edema tissular e liberação de mediadores químicos (KUMAR et al., 2005).

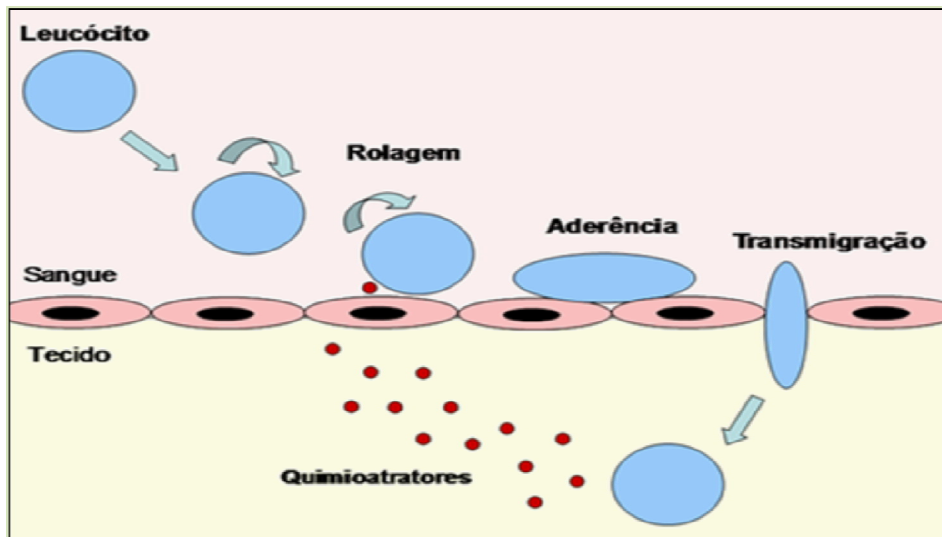
Os eventos vasculares são causados pela ligação dos mediadores químicos que incluem a bradicinina, o fator ativador de plaquetas (PAF), a serotonina, a histamina, o óxido nítrico (NO), as citocinas e o fator de necrose tumoral (TNF- α), e as prostaglandinas a receptores específicos localizados nas células alvo, e consequente indução de uma resposta (BHANDARI et al., 2005).

3.3.2 Eventos Celulares

O estágio celular da inflamação aguda é marcado pelo movimento dos leucócitos para a área de lesão ou trauma (**Figura 6**). As primeiras células fagocitárias a responder são principalmente os neutrófilos e, possivelmente outros granulócitos. Com a continuidade do processo, os monócitos deixam a corrente sanguínea e maturam, passando a macrófagos no ambiente tissular. Esses fagócitos de vida mais longa ajudam a destruir o agente causador, auxiliando na sinalização do processo de imunidade específica e atuam na resolução do processo inflamatório. A resposta celular dos fagócitos consiste na marginação ou pavimentação das paredes capilares por leucócitos devido ao aumento da adesividade

molecular, e migração dos leucócitos, quimiotaxia ou migração positiva das células para o local da adesão, além da fagocitose (KUMAR et al., 2005).

Figura 6. Representação esquemática da migração de leucócitos para o tecido lesado.



Fonte: crono.icb.usp.br/glandpineal.htm (12/12/2010).

Esse processo é controlado por agentes quimiotáticos, tanto de origem endógenas que são aqueles liberados pelas próprias células do hospedeiro (componentes do sistema de complemento, produtos da lipoxigenase, fator de ativação plaquetária (PAF) e citocinas), quanto de origem exógena, que são aqueles advindos do próprio agente agressor (produtos bacterianos de origem lipídica, como por exemplo, a endotoxina lipopolissacarídeo-LPS) (RIBEIRO et al., 1991; 1996; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

3.3.3 Mediadores Inflamatórios

Os mediadores inflamatórios atuam nos vasos sanguíneos e células inflamatórias modulando os principais eventos relacionados à inflamação: vasodilatação, opsonização, quimiotaxia para células inflamatórias, obstrução tecidual e dor, como também febre e mal estar (SIQUEIRA & DANTAS, 2000).

Os mediadores originam-se do plasma ou de células. Os mediadores oriundos de células normalmente estão sequestrados nos grânulos intracelulares, que precisam ser secretados (histamina nos grânulos de mastócitos) ou são sintetizados originalmente

(prostaglandinas, citocinas) em resposta a um estímulo (CONTRAN & ROBBINS, 2000). Substâncias endógenas e exógenas (*N*-formil-*N*-metionil-*N*-leucil-*L*-fenilalanina (fMLP), lipopolissacarídeo (LPS), carragenina e zymosan A) podem agir como agentes quimiotáticos.

Os mediadores endógenos são substâncias oriundas da ativação de células inflamatórias por uma reação imune ou por estimulação direta destas células por citocinas ou substâncias químicas. Muitos destes já foram identificados até o momento, podendo ser originados no plasma, sob a forma de precursores a serem ativados (proteínas do sistema complemento, das cininas e da coagulação) ou sintetizados e armazenados por células (serotonina, histamina, prostaglandinas, fator ativador plaquetário (PAF), leucotrienos e citocinas). A maioria dos mediadores químicos desempenha sua atividade biológica através da ligação específica com receptores presentes em células, entretanto alguns podem atuar diretamente como enzimas (proteases lisossomais) ou mediando lesões oxidativas diretas como ocorre com os metabólitos do oxigênio (ROBBINS et al., 1996).

Um grande número de mediadores tem sido implicado no processo de migração dos leucócitos do sangue ao foco de inflamação. Acredita-se que na fase precoce do processo inflamatório induzido por diferentes estímulos, células residentes no tecido, como macrófagos, mastócitos e linfócitos, participam no controle da migração de neutrófilos. Este controle é mediado pela liberação destes fatores quimiotáticos.

De acordo com Robbins e seus colaboradores (1996) os principais mediadores inflamatórios, sua origem e suas ações estão correlacionados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Mediadores da inflamação (ROBBINS et al., 1996)

Mediador	Origem	Ações
Histamina	Mastócitos, Basófilos	Aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa, quimiocinese
Serotonina	Plaquetas, Mastócitos (Roedores)	Aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa
Fatorativador de plaquetas (PAF)	Basófilos, Neutrófilos, Macrófagos	Liberação de mediadores das plaquetas; aumento da permeabilidade vascular; contração da musculatura lisa; ativação de neutrófilos
Fator quimiotático para neutrófilos (FQN)	Mastócitos, Basófilos	Quimiotaxia de neutrófilos

Continua

Tabela 3. Continuação

Mediador	Origem	Ações
Interleucina-5 (IL-5)	Linfócitos	Localização dos monócitos
Sistema de Complemento - C3a	Complemento C3	Desgranulação de mastócitos; contração da musculatura lisa
Sistema de Complemento - C5a	Complemento C5	Desgranulação de mastócitos; quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos; ativação de neutrófilos; contração da musculatura lisa; aumento da permeabilidade capilar
Bradicinina (BK)	Sistema das Cininas (cininogênio)	Vasodilatação; contração da musculatura lisa; aumento da permeabilidade capilar; dor
Fibrinopeptídeos e produtos da clivagem da fibronectina	Sistema coagulação	Aumento da permeabilidade capilar; quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos
Prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	Via da ciclooxigenase	Vasodilatação; potencialização da permeabilidade vascular aumentada pela produção de histamina e bradicinina
Leucotrieno 4 (LTB ₄)	Via da lipoxigenase	Quimiotaxia de neutrófilos, sinergia com PGE ₂ no aumento da permeabilidade vascular
Leucotrieno D ₄	Via da lipoxigenase	Contração da musculatura lisa; aumento da permeabilidade vascular

3.4 Dor e Nocicepção

A dor é um sintoma de muitas desordens clínicas e afeta grande parte da população (NIV & KREITLER, 2001). A associação Internacional para Estudo da Dor postula que a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada o dano real ou potencial ou descrita em termo de tal lesão (ELZAC & LOESER, 1999; RAINVILLE, 2002; ALMEIDA et al., 2004).

A dor é um atributo cardinal dos mecanismos protetores fisiológicos normais e uma das suas funções é resguardar o organismo, impedindo o dano tecidual. O sistema nervoso informa sobre a ocorrência ou perigo de injúria, e a sensação de dor colabora para esta função estando, deste modo relacionado às reações de fuga e esquivia (BESSON & DICKESON, 1997; RIEDEL & NEECK, 2001).

A manifestação neurofisiológica da dor é denominada nocicepção. De uma forma geral, o estímulo nociceptivo depende da ação de mediadores que são comuns no processo inflamatório (JI & STRICHARTSZ, 2004).

A dor pode ser controlada por mecanismos centrais, uma vez que o sistema nervoso possui circuitos modulatórios que modificam a percepção da dor. O local primário desta modulação é a medula espinhal, onde a interconexão entre vias nociceptivas e não-nociceptivas podem controlar a transmissão da informação nociceptiva para os centros supra-espinhais (BASBAUM & JESSEL, 2004).

3.4.1 Classificação dos Diferentes Tipos de Dor

Em termos de duração, a dor pode ser aguda ou crônica. A dor aguda está associada com uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores e pode desaparecer até mesmo antes da cura do dano tecidual. Por outro lado, a dor crônica pode se perpetuar por meses ou anos, e tem como característica a persistência e alterações adaptativas, o que muitas vezes dificulta o tratamento (PARK & VASKO, 2005).

A dor pode ser classificada também quanto à fisiopatologia em: nociceptiva, neurogênica, neuropática, inflamatória e psicogênica.

A dor nociceptiva ocorre por estimulação química ou física de terminações nervosas normais, podendo ser resultado de danos teciduais como inflamações, traumas, manobras invasivas ou isquemias. (RANG et al., 2007).

A dor neurogênica está associada com a lesão do tecido neural (BESSON, 1999).

Lesões periféricas ou centrais, tendo por causa doenças infecciosas, inflamatórias ou degenerativas, traumas físicos ou químicos entre outros estão relacionados com a dor neuropática. (MILLAN, 1999).

Já a dor inflamatória é caracterizada normalmente pela presença de mediadores químicos que podem atuar diminuindo o limiar dos nociceptores, ativando os receptores ou ambos, dependendo do tipo de substância liberada o que caracteriza hiperalgesia. Esses receptores geralmente são polimodais sensíveis a estímulos químicos, térmicos e mecânicos. (FERREIRA, LORENZETTI & POOLE, 1993).

A dor psicogênica é aquela que não possui causa orgânica, mas se expressa em consequências de problemas psicológicos (MENESES, 1999).

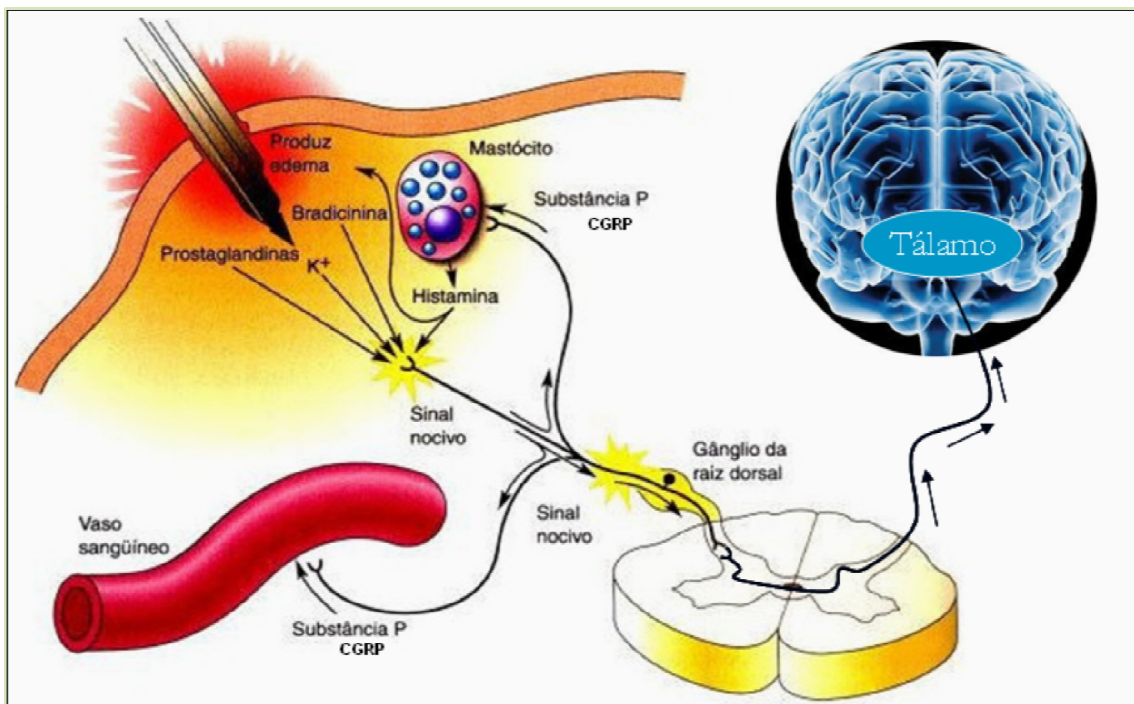
3.4.2 Fisiologia da Dor

A transmissão da dor está associada à atividade elétrica nas fibras nervosas aferentes primárias, que possuem terminações livres no tecido periférico (pele, músculos, articulações, vísceras, conjuntivo dentre outros) (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Estas terminações nervosas são receptores sensoriais especializados denominados de nociceptores. Estes receptores possuem alto limiar de ativação sendo ativados por estímulos intensos que são densos ou potencialmente danos aos tecidos. Portanto não são recrutados em estímulos inócuos (CALLIET, 1993; DJOUHRI & LAWSON, 2004).

As fibras nociceptivas possuem duas extremidades: a primeira detecta sensações e se projeta para regiões periféricas onde inerva pequenas porções de tecido; já a segunda extremidade estende-se até o interior do corno da medular espinal dorsal. Entre esses dois segmentos ficam os corpos celulares dos nociceptores, localizado em uma estrutura fora da medula espinal. O agente nocivo é detectado pela extremidade periférica, na pele ou algum outro órgão onde um impulso elétrico é disparado e propagado por toda a fibra nervosa até atingir uma região da medula espinal (**Figura 7**) (BASBAUM & JULIUS, 2006).

Figura 7. Mediadores envolvidos na nocicepção



Os nociceptores são sensibilizados após uma lesão tecidual ou inflamação produzindo uma resposta dolorosa. Comumente em humanos, esta sensibilização sensorial primária é referida como hiperalgesia (sensibilidade aumentada para um estímulo doloroso) ou alodínia (dor devido a um estímulo previamente não nocivo) (VERRI et al., 2006).

As substâncias químicas são liberadas no tecido em decorrência de processos inflamatórios, traumáticos e isquêmicos. Algumas de produção local, como a bradicinina, citocinas, histamina, prostaglandinas e serotonina. Outras substâncias são produzidas no corpo neuronal para a região lesionada, sendo as mais importantes a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (MARQUES, 2004). A substância P e o CGRP contribuem para o aumento de edema, atuando diretamente sobre as vênulas para produzir vasodilatação (inflamação neurogênica). Eles também contribuem para a hiperalgesia pela liberação de histamina dos mastócitos (BASBAUM & JESSELL, 2004).

Os receptores específicos para a dor estão situados nas terminações de fibras nervosas A δ e C que, quando ativados, sofrem modificações na sua membrana, permitindo a deflagração de potenciais de ação. As terminações nervosas das fibras nociceptivas A δ e C (nociceptores) são capazes de traduzir um estímulo agressivo de natureza térmica, química ou mecânica, em estímulo elétrico que será transmitido até o sistema nervoso central (SNC) e interpretado no córtex cerebral como dor. As fibras A δ são mielinizadas e as fibras C não são mielinizadas e possuem a habilidade de transmitir estímulos dolorosos em diferentes velocidades. As fibras A δ , em função da presença da bainha de mielina, transmitem o estímulo doloroso de maneira rápida, enquanto as fibras C são responsáveis pela transmissão lenta da dor (queimação) (ROCHA; KRAYCHETE & LEMONICA, 2007).

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas ao longo dos últimos anos para o estudo dos mecanismos e dos mediadores envolvidos na inflamação e dor (SANTI-GADELHA et al., 2006; NAPIMOGA et al., 2007; TRACEY & MANTYH, 2007; BITENCOURT et al., 2008; BASBAUM et al., 2009; NUNES et al., 2009; ALENCAR et al., 2010; GRIS et al., 2010; HUA & CABOT, 2010; MEDZHITOV, 2010; SILVA et al., 2010; VANDERLEI et al., 2010; ROCHA et al., 2011). Deste modo, pesquisa de substâncias naturais que possam intervir na complexidade das injúrias citadas é de grande valor, uma vez que a maioria destas substâncias, incluindo as lectinas, é na maioria das vezes de fácil obtenção e baixo custo.

4 EXPERIMENTAL

4 EXPERIMENTAL

4.1 Atividades Desenvolvidas e Locais de Realização

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida em três etapas: i) purificação da lectina; ii) caracterização das lectinas; iii) ensaios farmacológicos (avaliação da atividade antinociceptiva e atividade anti-inflamatória).

As etapas da purificação das lectinas foram realizadas no Laboratório de Enzimologia e Biotecnologia Vegetal do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas e no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Os procedimentos relacionados com a caracterização das lectinas foram realizados no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Os ensaios farmacológicos foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas em colaboração com a Prof^a. Dra. Eliane Aparecida Campesatto Mella.

4.2 Isolamento, Purificação e Detecção da Lectina de Sementes de *Canna limbata*

4.2.1 Material Botânico

4.2.1.1 Obtenção das Sementes de *Canna limbata*

As sementes de *Canna limbata* (**Figura 8**) foram obtidas do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, que realiza periodicamente coletas na região serrana do estado do Rio Grande do Sul, onde a planta apresenta larga ocorrência na sua variedade fértil.

Figura 8. Sementes de *Canna limbata*.

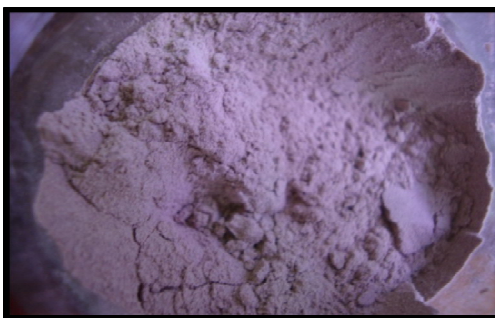


Fonte: [http://www.infoescola.com/plantas/familia-cannaceae/\(12/12/2010\)](http://www.infoescola.com/plantas/familia-cannaceae/(12/12/2010)).

4.2.1.2 Preparo da Farinha de Sementes de *Canna limbata*

As sementes de *Canna limbata* foram trituradas em liquidificador industrial Beccaro, para a obtenção de uma farinha fina (**Figura 9**). O material obtido foi estocado em frascos hermeticamente fechados e mantido a 24 °C no Laboratório de Enzimologia e Biotecnologia Vegetal do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas até utilização.

Figura 9. Farinha de *Canna limbata*.



4.2.1.3 Extração das Proteínas

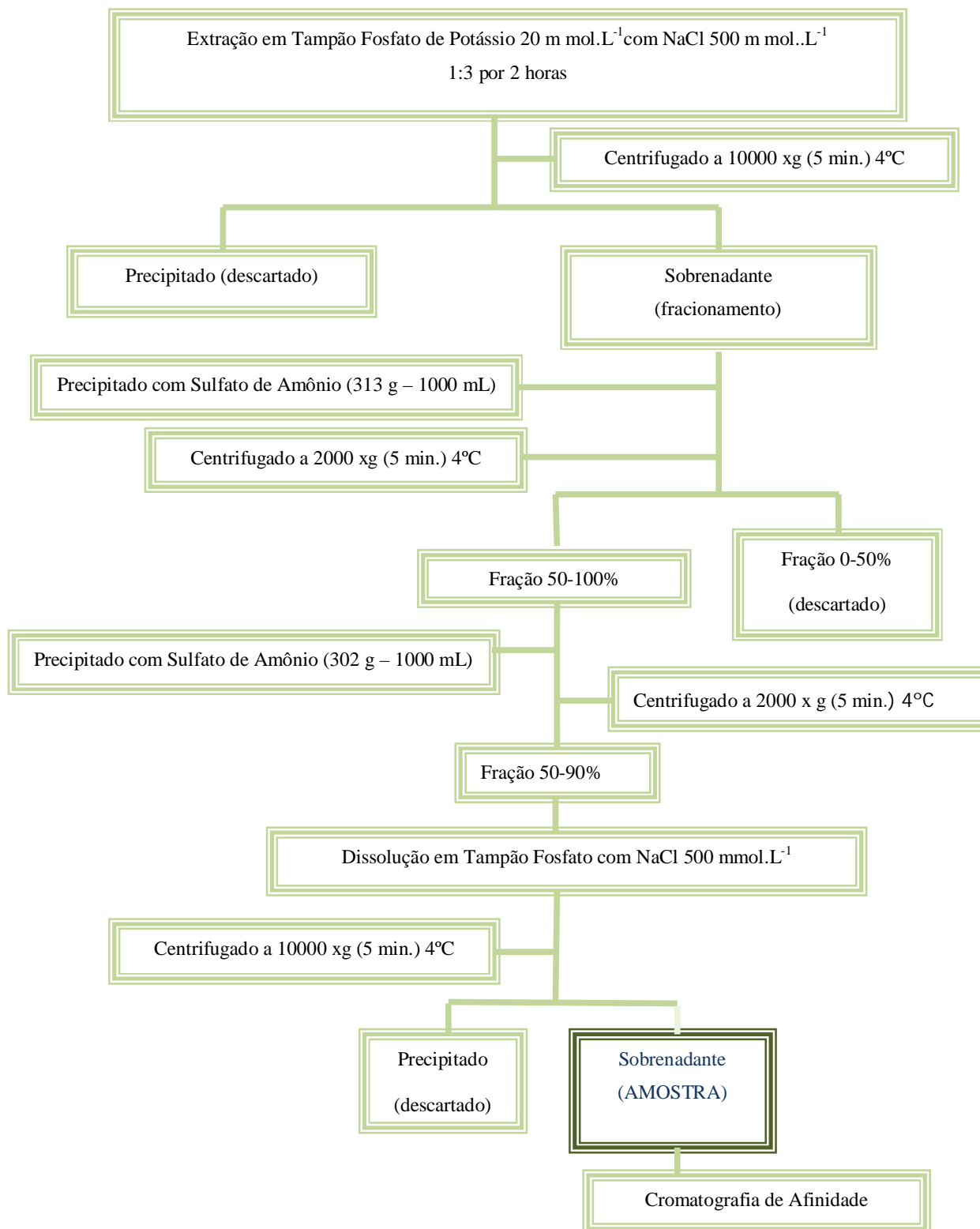
A farinha de *Canna limbata* foi submetida à extração, com tampão fosfato de potássio 20 mmol.L⁻¹ pH = 7,2 contendo NaCl 500 mmol.L⁻¹, na proporção de 1g do triturado para 3 mL de solução, sob agitação contínua em um agitador magnético (QUIMIS) por 2 horas.

Após o período de extração a fração solúvel foi separada do precipitado por filtração e a amostra foi centrifugada a 10.000 xg por 5 minutos a 4°C em centrífuga modelo 3K30 (SIGMA).

A seguir o sobrenadante do material centrifugado foi submetido à precipitação salina com adição constante de sulfato de amônio (313 g/1000 mL). Após solubilização completa o material foi deixado em repouso por um período de 12 horas (“overnight”). Posteriormente a precipitação, o material foi centrifugado a 2000 xg por 5 minutos a 4°C em centrífuga modelo 3K30 (SIGMA). No sobrenadante concentrou-se a fração correspondente a 50-100 % de saturação. O sobrenadante coletado foi filtrado e novamente submetido ao processo de precipitação por adição de sulfato de amônio (302 g / 1000 mL) em agitação constante e posterior repouso “overnight”.

Após o período de precipitação, o material foi mais uma vez centrifugado a 2000 xg por 5 minutos a 4°C em centrífuga modelo 3K30 (SIGMA) e o precipitado representando a fração 50-90 % de saturação foi solubilizado em tampão fosfato de potássio 20 mmol.L⁻¹ contendo NaCl 500 mmol.L⁻¹. Por fim, foi realizada uma centrifugação a 10.000 xg por 5 minutos a 4°C em centrífuga modelo 3K30 (SIGMA) e o sobrenadante resultante foi posteriormente submetido à análise cromatográfica de afinidade em coluna de quitina (SIGMA-ALDRICH). O protocolo de extração e isolamento foi adaptado da metodologia de OITA et al., 2000 (**Figura 10**).

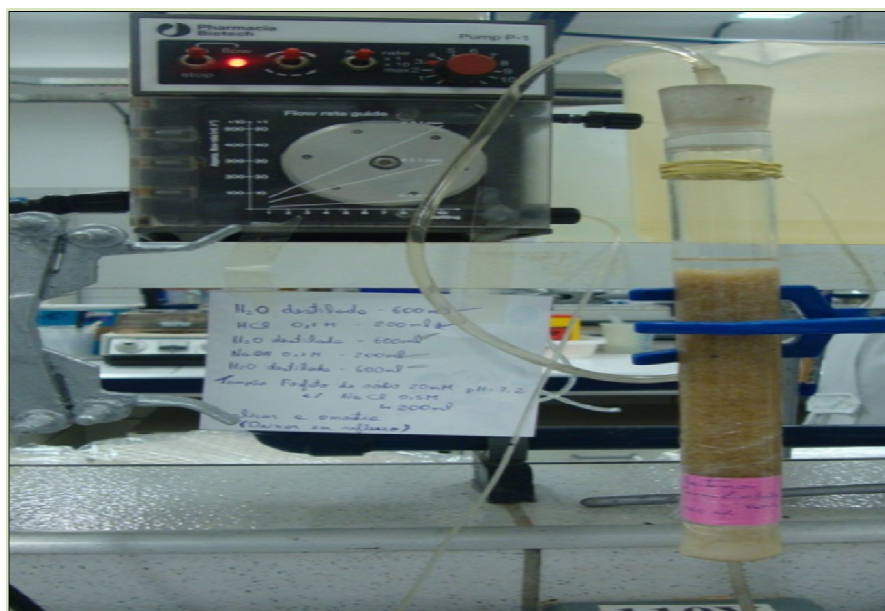
Figura 10. Protocolo de extração das proteínas de semente de *Canna limbata*.
(Adaptado da metodologia de OITA et al., 2000).



4.2.2 Purificação da Lectina de Sementes de *Canna limbata* por Cromatografia de Afinidade em Quitina (polímero de N-acetilglicosamina).

Uma alíquota de cerca de 2,0 a 3,0 mL (5 mg.mL^{-1}) do material ressuspenso correspondente à fração 50-90 % foi aplicada em coluna de quitina (SIGMA-ALDRICH) ($v=20 \text{ mL}$) previamente equilibrada com a solução tampão fosfato de potássio 20 mmol.L^{-1} , pH 7,2 contendo $\text{NaCl } 500 \text{ mmol.L}^{-1}$. A amostra aplicada foi deixada em refluxo por 12 horas, a fim de permitir um tempo maior de interação com a coluna, utilizando bomba de fluxo peristáltica (**Figura 11**). O material não retido foi eluído com tampão fosfato de potássio 20 mmol.L^{-1} , pH = 7,2, com $\text{NaCl } 500 \text{ mmol.L}^{-1}$ e o material retido (lectina) foi eluído com solução de ácido acético 500 mmol.L^{-1} . Foram coletado 2 mL por fração. As frações coletadas foram monitoradas pela medida da absorvância a 280 nm em espectrofotômetro UV-Visível GENESYS 10S para obtenção do cromatograma. Os picos obtidos foram dialisados contra água (20 trocas), liofilizados e em seguida estocados a 5°C , para serem utilizados posteriormente nas demais determinações.

Figura 11. Coluna de quitina conectada a bomba de fluxo peristáltica.



4.2.3 Determinação da Concentração de Proteínas

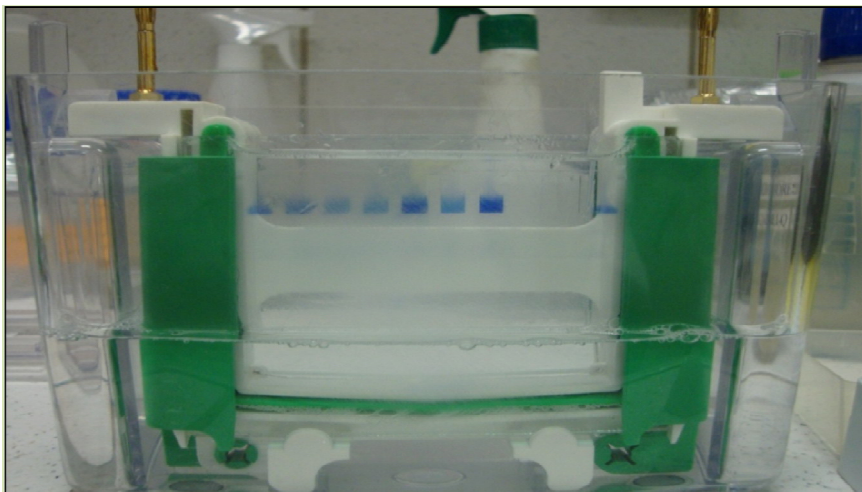
A concentração de proteínas das amostras foi determinada de acordo com o descrito pelo método de BRADFORD (1976). A cada 100µl da amostra adicionou-se 2,5 mL de reagente de Bradford. Após agitação a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos, e em seguida, realizou-se a leitura a 595 nm em espectrofotômetro VIS LKB Novaspec II (Pharmacia). A concentração da proteína na mistura foi determinada a partir de uma curva padrão utilizando a proteína Albumina do Soro Bovino (BSA) (SIGMA-ALDRICH) como proteína padrão.

4.2.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e 2-Mercaptoetanol

A massa molecular das cadeias polipeptídicas foi estimada utilizando os ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SIGMA-ALDRICH) e 2-mercaptoetanol (SIGMA-ALDRICH) segundo LAEMMLI (1970) (**Figura 12**). O gel de empilhamento foi preparado com 3,5 % de poliacrilamida, solução tampão tris-HCl 0,5 mol.L⁻¹, pH 6,8 e SDS a 1 % e o gel de separação foi preparado com 12 % de poliacrilamida, solução tampão tris-HCl 3 mol.L⁻¹, pH 8,8 e SDS a 1 %.

As amostras liofilizadas, obtidas das diferentes frações protéicas e das diferentes cromatografias foram submetidas à eletroforese na concentração de 1 mg.mL⁻¹ solubilizada em solução tampão tris - HCl 0,0625 mol.L⁻¹, pH 8,3, contendo SDS a 1%, 2-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol a 0,02% (tampão de amostra). Aplicou-se 10 µL da amostra nos poços e realizou-se a corrida eletroforética a uma corrente constante 40 mA com voltagem variável entre 124-150 Volts por um período de 4 horas. Ao final da corrida, o gel foi corado com Comassie Brilliant Blue R-250 (SIGMA - ALDRICH) a 0,05 %, preparado em uma solução de metanol (VETEC), ácido acético (VETEC) e água (1: 3,5: 8 v/v/v), por um período de 12 horas e o excesso do corante retirado com uma solução de metanol, ácido acético e água (1:3,5:8 v/v/v), para melhor visualização das bandas protéicas. As proteínas usadas como marcadores de massa molecular foram: albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), carbonic anhydrase (bovine erythrocytes) (29 kDa), inibidor tripsina (21 kDa), citocromo C (12,4 kDa) e aprotinin (bovine lung) (6,5 kDa).

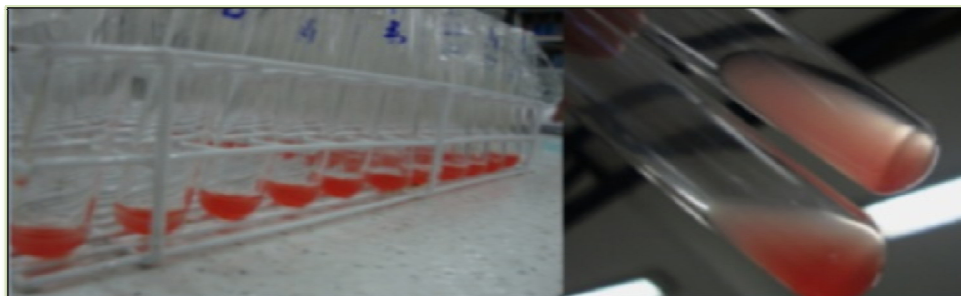
Figura 12. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e 2-Mercaptoetanol.



4.2.5 Determinação da Atividade Hemaglutinante.

A atividade hemaglutinante do extrato e das diferentes frações protéicas foi realizada de acordo com o método descrito por AINOUZ e colaboradores (1992). A atividade hemaglutinante da *Canna limbata* (**Figura 13**) foi determinada utilizando eritrócitos de coelho tratado e não tratados com enzimas proteolíticas (papaína e tripsina), na presença ou ausência de íons (cálcio e manganês). Os poços que continham somente a suspensão de eritrócitos 2 % em NaCl 0,15 mol.L⁻¹ serviram como controle. Os ensaios foram realizados em duplicata pelo método da diluição serial (1:2, 1:4, 1:8, ...) utilizando solução tampão tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 mol.L⁻¹. Para 100 µL de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de eritrócitos a 2 % em NaCl 0,15 mol.L⁻¹. O material foi então incubado a 37 °C por 30 minutos e deixado em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos, quando, então, o grau de aglutinação macroscópico foi observado. Em seguida para verificar uma dependência de metais para atividade de aglutinação foram adicionados os íons cálcio e manganês, o material ficou em repouso por 12 horas à temperatura ambiente, quando então, os títulos de hemaglutinação foram determinados como sendo o inverso da maior diluição que é capaz de apresentar aglutinação visível a olho nu. A atividade de hemaglutinação foi expressa em unidade de hemaglutinação por mililitro (UH/mL).

Figura 13. Determinação da atividade hemaglutinante.



4.2.6 Determinação da Atividade Específica

A atividade específica foi determinada pela razão numérica entre a atividade hemaglutinante e a massa de proteína. A atividade específica foi expressa por unidade de hemaglutinação por miligrama de proteína (UH/mgP).

4.2.7 Cromatofocalização em Coluna Mono P da Lectina da Semente de *Canna limbata*.

Um miligrama da amostra obtida da cromatografia de afinidade foi submetida à cromatofocalização em Coluna Mono P HR 5/5 (1,0 x 17 cm) acoplada a um sistema de cromatografia de alta performance (ÄKTA System), como tentativa de determinação do ponto isoelétrico. A amostra foi solubilizada em 1 mL do tampão de tris - HCl, 25 mmol.L⁻¹, pH 7,5 e aplicada na coluna, previamente equilibrada com o mesmo tampão. Após remoção do material não retido através de lavagem com o tampão de tris - HCl, 25 mmol.L⁻¹, pH 7,5, a lectina foi eluída com um gradiente linear de pH de 7 a 4 utilizando-se pollybuffer 74, com leitura de absorbância a 280 nm e um fluxo constante de 1 mL.min⁻¹.

4.2.8 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de Amônio Quaternário (Mono Q HR 5/5) Acoplada a um Sistema de Cromatografia de Alta Performance (SistemaÄKTA) da Lectina de *Canna limbata*.

A proteína liofilizada obtida da cromatografia de afinidade por quitina (1 mg) foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de amônio quaternário (Mono Q HR

5/5) acoplada a um sistema de cromatografia de alta performance (Akta System). A amostra foi dissolvida em 1 mL de tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0 e aplicada na coluna de troca iônica (1,0 x 1,7 cm) previamente equilibrada com tampão de tris-HCl, 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0. Após remoção do material não retido através de lavagem com o tampão de equilíbrio (tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0), o pico retido na coluna e que apresentou atividade hemaglutinante, portanto a lectina, foi eluído com um fluxo de 1 mL.min⁻¹ com o tampão de equilíbrio contendo NaCl em um gradiente linear de 0-1 mol.L⁻¹. As absorvâncias foram monitoradas 280 nm e coletadas manualmente. O pico obtido foi dialisado exaustivamente contra água, liofilizado e estocado a 5° C para sequenciamento.

4.2.9 Sequenciamento N-terminal

A análise da sequência N-terminal da lectina purificada foi realizada em um sequenciador automático de proteínas (Applied Biosystem) e determinado pelo método de degradação de Edman (EDMAN, 1950).

Dois miligramas da lectina purificada por cromatografia de troca iônica em coluna Momo Q HR 5/5 foram dissolvidos em 200 µL de cloridrato de guanidina 6 mol.L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Germany) contendo 0,4 mol.L⁻¹ de tris-HCl e 2 mmol.L⁻¹ de ácido etilenoaminotetracético (EDTA) (pH 8,15). A solução de proteína foi deixada em nitrogênio por 15 minutos, reduzida com 200 µL de ditioneitol (DTT) 6 mol.L⁻¹ e carboximetilada com ácido iodoacético ¹⁴C-ácido iodoacético gelado. Esta solução foi incubada no escuro a 37° C por uma hora e aplicada a uma coluna de Sephadex G25 (0.7 x 12 cm) eluída com tampão ácido acético 1 mol.L⁻¹. A lectina reduzida e carboximetilada (RC-Lec) foi liofilizada e estocada a - 80° C. Aproximadamente 2 nmols.mL⁻¹ da RC-lec foram dissolvidos em 100 µL de solução de acetonitrila (66% de acetonitrila em ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%).

A sequência N-terminal encontrada foi comparada com sequências do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

4.2.10 Análise por Espectrometria de Massa ESI-MS

Foi preparado uma solução da proteína liofilizada purificada da cromatografia de afinidade por quitina numa concentração de 4 mg.mL⁻¹ em água e a partir desse estoque foi feito uma solução de 10 pmol em Acetonitrila:Água (50:50) contendo 0,1% de ácido fórmico.

Esta solução então foi injetada em uma fonte de ionização do tipo elétron spray num fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ acoplada em um espectrômetro de massa Quattro-II triplo-quadrupolo (Micromass, Altrincham, UK) operando em modo positivo, com energia do capilar de 1,78 kV, temperatura da fonte de 80° C e fluxo de nitrogênio de 200 L/h. Os dados foram coletados pelo software Masslynx e o espectro multi carregado foi deconvoluído utilizando técnicas de maximização de entropia utilizando o software MaxEnt.

4.3 Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória

4.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (25-30 g) de ambos os sexos (**Figura 14**), com 6 a 8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Os animais foram mantidos na temperatura de 24°C, com acesso contínuo a água e ração comercial. Oito horas antes do início dos experimentos os animais eram deixados em jejum com livre acesso a água. Foram utilizados 6 animais por grupo nos ensaios, estes foram escolhidos aleatoriamente. Após os experimentos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

O trabalho teve aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (Protocolo n° 015102/2010-51) (**ANEXO A**). Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Alagoas para manuseio de animais em modelos de inflamação (ZIMMEMAN, 1983).

Figura 14. Camundongos da Linhagem Swiss.



4.3.2 Substâncias Utilizadas

Foram usados nos diferentes ensaios: Ácido acético P.A. glacial (VETEC); Azul de Tripán (SIGMA); Carboximetilcelulose - CMC (SIGMA); Cloreto de Sódio - NaCl (SIGMA-ALDRICH); Formaldeído P.A. (VETEC); Tween 80 (SIGMA-ALDRICH); Zymosan A (SIGMA-ALDRICH). Como fármacos padrões foram utilizados: dipirona (SIGMA-ALDRICH), indometacina (MERCK) e sulfato de morfina (Dimorf - CRISTÁLIA, BR).

4.3.3 Ensaio de Contorção Abdominal Induzida por Ácido Acético

O perfil antinociceptivo foi avaliado através do ensaio de contorções abdominais induzida por ácido acético. Nesse ensaio o ácido acético 0,6 % atua como um estímulo nocivo quando injetado na cavidade peritoneal do camundongo. Quarenta minutos após o tratamento com as frações de lectina de *Canna limbata* [0,1 mg/Kg, 1 mg/Kg, 5 mg/Kg e 10 mg/Kg via oral (v. o.)] e o fármaco padrão [dipirona - 40 mg/kg, via intraperitoneal (v.i.p.)] foi realizada a administração do ácido acético 0,1 mol.L⁻¹ (0,1 mL/10 g de peso) na cavidade peritoneal dos animais. Cinco minutos após a injeção do agente flogístico, as contorções foram contadas durante 20 minutos (**Figura 15**), estas contorções consistem basicamente no arqueamento das costas, alongamento do corpo e extensão das patas traseiras (**Figura 16**). As frações foram administradas via oral em uma suspensão de carboximetilcelulose (CMC) e Tween 80®. O grupo controle recebeu o mesmo veículo (CMC e Tween 80®) utilizado para solubilizar as frações. Calculou-se a porcentagem de indução da inibição mediante a redução do número de contorções totais nos grupos tratados com as frações testes em relação ao grupo controle positivo (COOLIER et al., 1968).

Figura 15. Esquema do ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.

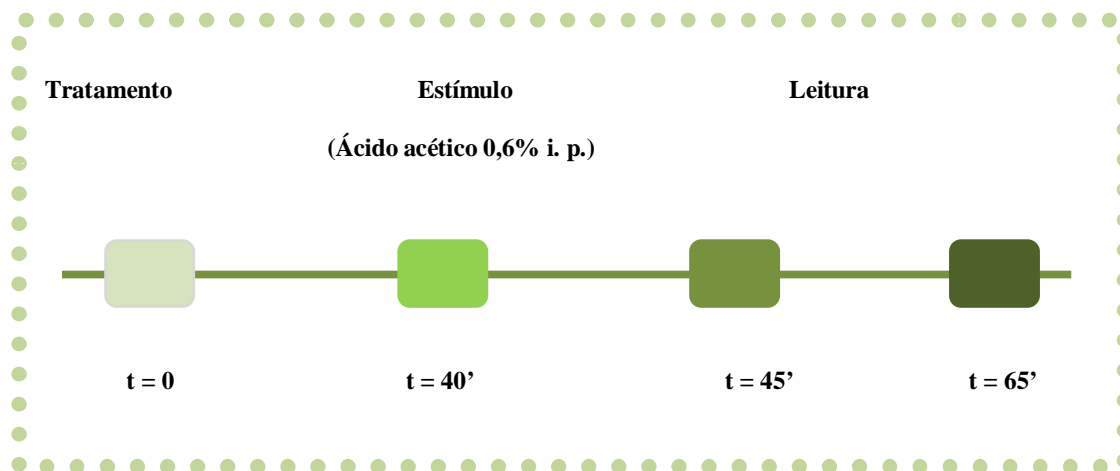
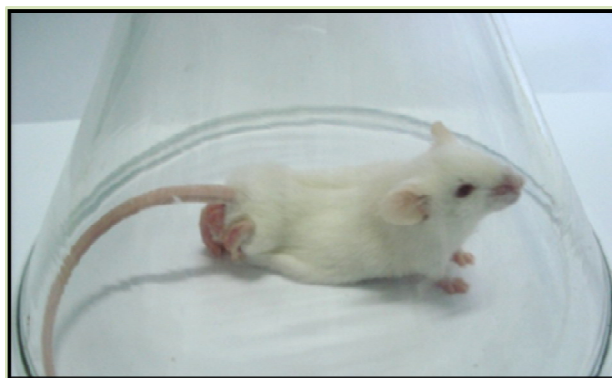


Figura 16. Contorção abdominal de um camundongo induzida por ácido acético 0,6 %.



4.3.3 Ensaio de Nociceção Induzida por Formalina

O ensaio consiste na injeção de 20 μL de uma solução de formalina 2,5 % (formaldeído diluído em salina) na face dorsal da pata traseira do animal (**Figura 17**). Esse ensaio é caracterizado por duas fases distintas: uma fase neurogênica (1ª fase) e outra inflamatória (2ª fase). As frações da lectina de *Canna limbata* (0,1 mg/Kg, 1 mg/Kg, 5 mg/Kg e 10 mg/Kg) e o fármaco padrão (indometacina - 35,7 mg/kg) foram administradas via oral em uma suspensão de CMC e Tween 80®, 40 minutos antes da administração da formalina.

O grupo controle recebeu o mesmo veículo (CMC e Tween 80®) utilizado para solubilizar as frações. O tempo (segundos) em que o animal permanência lambendo a pata foi registrado com cronômetro, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção (Resposta ao Estímulo Doloroso) (**Figura 18**). Com base no padrão de respostas foi possível estabelecer as duas fases: a primeira fase - observação dos primeiros cinco minutos, e segunda fase - 15 a 30 minutos após a injeção, que são respectivamente relacionadas à dor neurogênica e dor inflamatória (**Figura 19**) (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

Figura 17. Injeção de 20 µL de uma solução de formalina 2,5 % na face dorsal da pata traseira do animal.



Figura 18. Esquema do ensaio de nocicepção induzida por formalina.

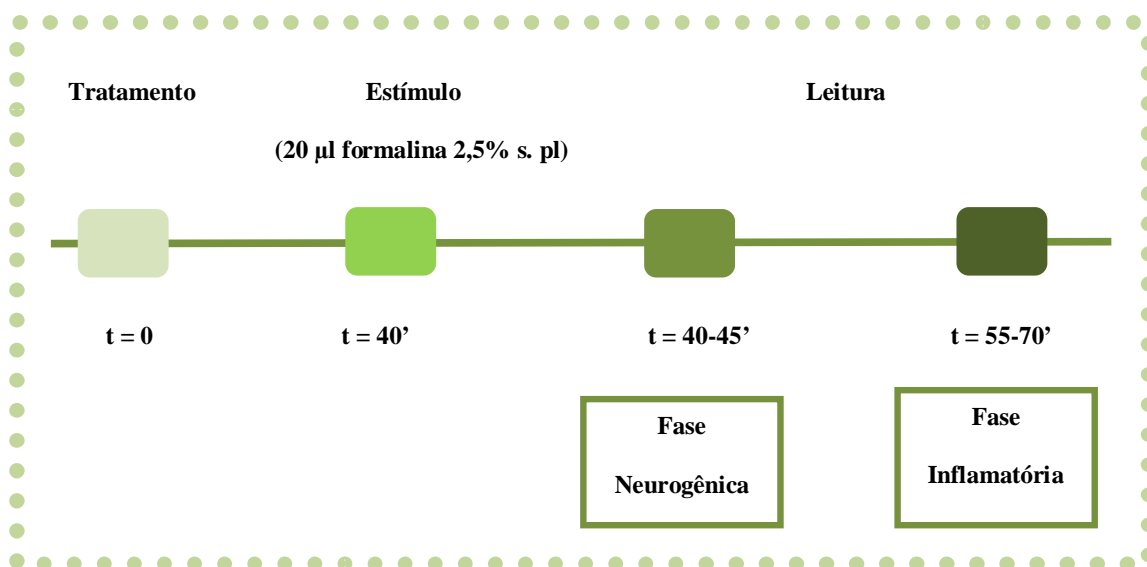
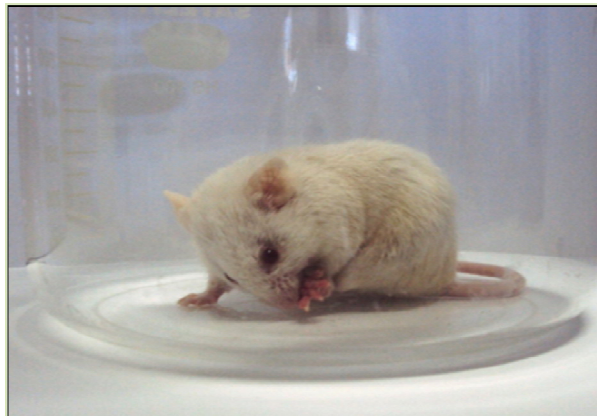


Figura 19. Camundongo lambendo a pata em resposta a injeção subplantar de formalina 2,5 %.



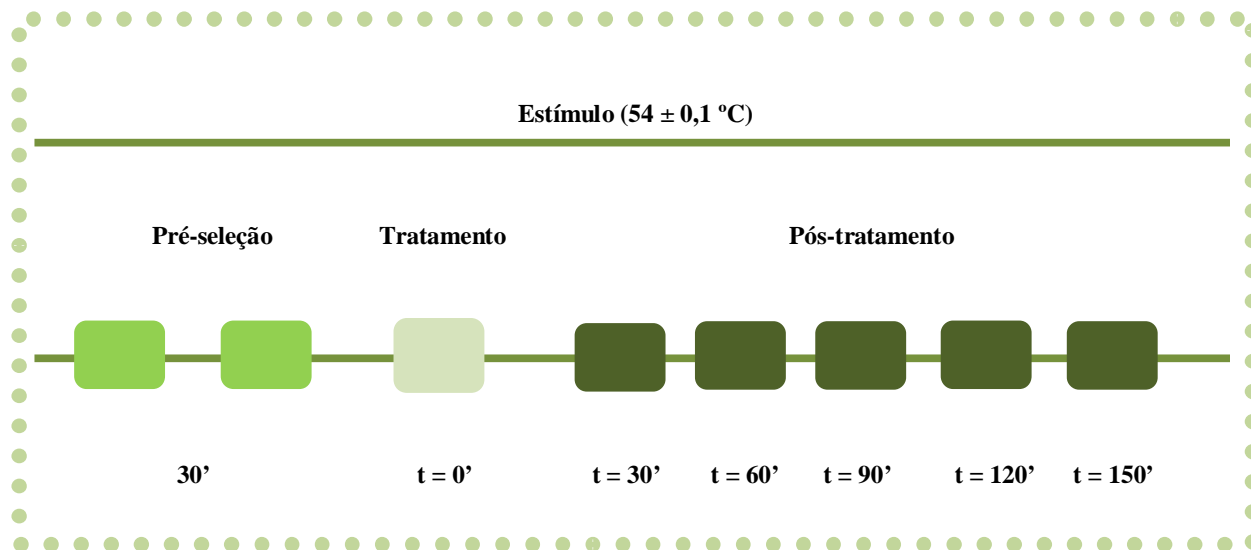
4.3.4 Ensaio da Placa Quente (HOT PLATE TEST)

A atividade antinociceptiva central foi avaliada através do teste da placa quente a $54 \pm 0,1$ °C. Os camundongos foram colocados sobre a placa aquecida de metal (**Figura 20**) e suas respostas ao estímulo térmico, retirada das patas traseiras ou dianteiras (tempo de latência) foram cronometrados. Foram feitas duas medidas controle em intervalos de 30 minutos, estabelecendo-se o tempo de “CUT – OFF” (máximo de permanência do animal na placa) de 10 segundos. A primeira medida controle foi realizada para seleção dos animais, foram retirados dois animais por grupo, os que apresentaram o maior e o menor tempo de permanência na placa, e a segunda medida controle consistiu na adaptação do animal na placa. Feito isso, as frações de lectina de *Canna limbata* (0,1 mg/Kg, 1 mg/Kg, 5 mg/Kg e 10 mg/Kg v. o.) e o fármaco padrão (morfina - 4,3 mg/Kg via subcutânea (v. sc) foram administradas e as medidas dos tempos de respostas foram registradas após um intervalo de 30 minutos. As novas medidas do tempo de latência foram registradas em intervalos de 30 minutos por duas horas (**Figura 21**) (KURAIISHI, 1983).

Figura 20. Ilustração de um camundongo em placa quente.



Figura 21. Esquema do ensaio de placa quente.



4.3.5 Ensaio de Peritonite Induzida por Zymosan A

Os animais foram tratados com as frações de lectina de *Canna limbata* (0,1 mg/Kg, 1 mg/Kg, 5 mg/Kg e 10 mg/Kg v. o.) ou indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) e depois de 40 minutos foram submetidos ao ensaio de peritonite, por administração intraperitoneal de 0,5

mL de uma solução estéril de Zymosan A (2 mg/mL). O Zymosan A é um componente insolúvel de polissacarídeo da parede de célula do fermento *Sacharomyces cerevisiae*. Ele induz degranulação de célula do Sistema Mononuclear Fagocitário e ativa os macrófagos. Quando administrado na cavidade peritoneal do camundongo, o Zymosan A induz um extravasamento vascular aumentado, um dos sinais primários de inflamação. Isto é um passo chave na formação inflamatória de exsudato e é seguido por um recrutamento tempo-dependente de células migratórias, especialmente neutrófilos (LEITE et al., 2007).

Após 6 horas da injeção de Zymosan A, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e imediatamente submetidos à cirurgia para abertura do abdômen e a cavidade peritoneal foi lavada com 3 ml de uma solução tampão fosfato salina pH 7,4 (PBS). Após a massagem do abdômem, o lavado peritoneal foi coletado (**Figuras 22 e 23**). Em seguida realizou-se a análise do lavado peritoneal (cerca de 2mL).

Para a contagem do número total de células, 10 µl do fluido peritoneal foi coletado de cada camundongo, diluídos e homogeneizados em 190 µl de azul de Tripán, obtendo uma diluição de 1:20. Dessa solução, 10 µl foram transferidos para a câmara de Neubauer onde foi realizada a contagem de 2 quadrantes com subsídio de um microscópio óptico e objetiva de 40x. O número de células recrutadas foi obtido utilizando o cálculo abaixo:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de células}}{\text{mL}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \cdot \text{fator de diluição} \cdot 10.000$$

Figura 22. Esquema do ensaio de peritonite induzida por Zymosan A.

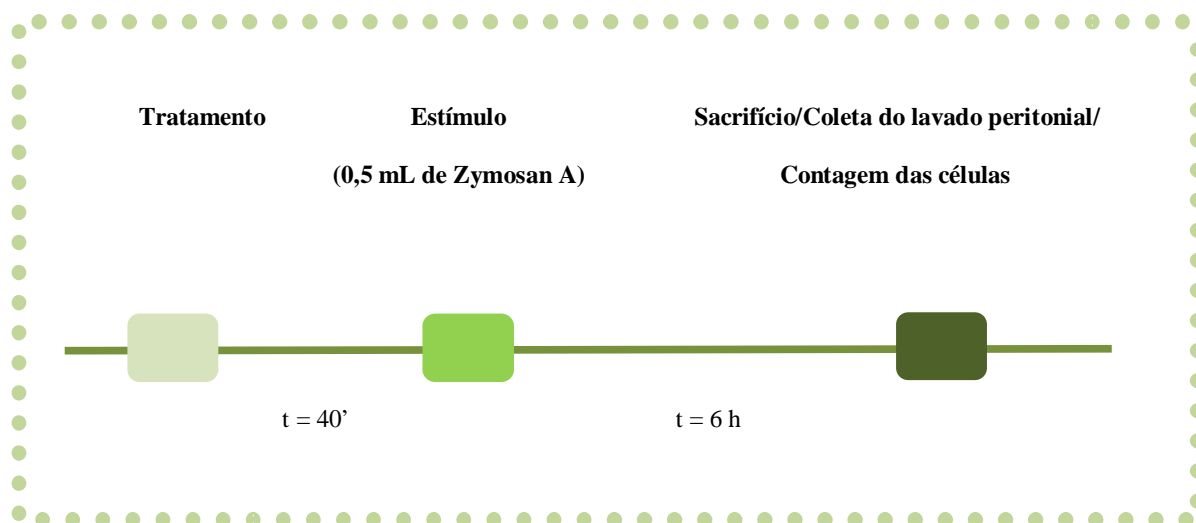


Figura 23. Coleta do lavado peritoneal após 6 horas da injeção intraperitoneal de Zymosan A.



4.3.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no tutorial GraphPad Prisma® versão 3.0. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e controle foram verificadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E. P. M.), conforme indicado nas legendas das tabelas e figuras.

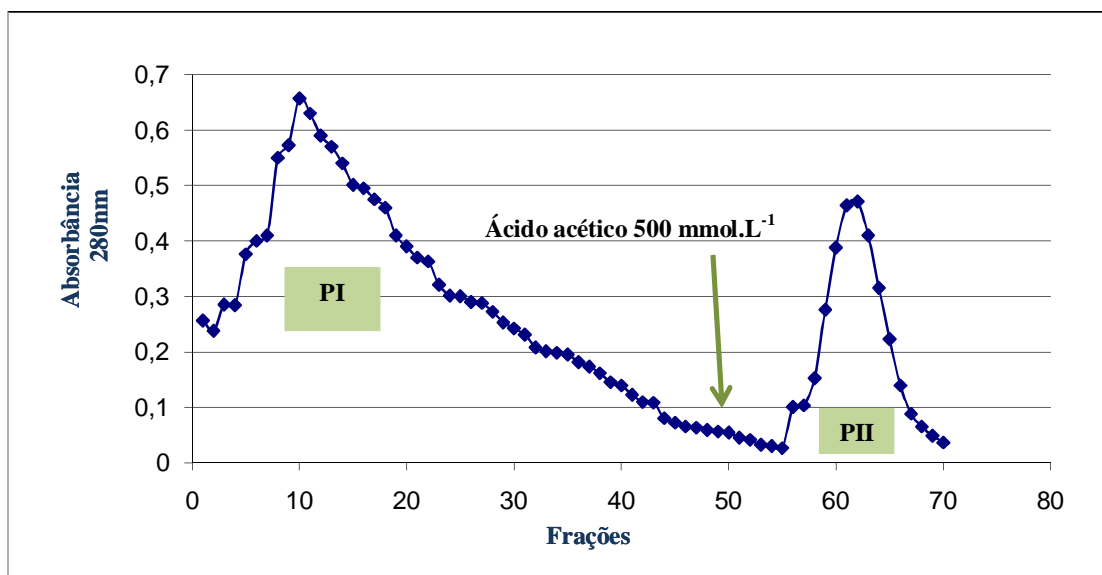
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Isolamento, Purificação e Detecção da Lectina de sementes de *Canna limbata*.

Os extratos protéicos foram obtidos por extração salina exaustiva. O protocolo de isolamento e purificação da lectina de sementes de *Canna limbata*, por cromatografia de afinidade em matriz de quitina, resultou em um cromatograma que apresentou pico (PI) eluído com tampão fosfato 20 mmol.L⁻¹ com NaCl 500 mmol.L⁻¹ que corresponde ao material não retido pela coluna e um pico (PII) eluído com ácido acético 500 mmol.L⁻¹ que corresponde ao retido pela coluna, conforme consta na **Gráfico 1**.

Gráfico 1. Cromatografia de afinidade em coluna de quitina.



O perfil cromatográfico obtido com a aplicação do extrato em cromatografia de afinidade apresentou um pico incolor (PI) e um pico pigmentado com coloração amarelada (PII).

Estão apresentados na tabela de purificação (**Tabela 4**) os resultados da dosagem de proteínas solúveis, atividade hemaglutinante e atividade específica testada frente eritrócitos de coelho do extrato total, da fração 50-90% e PII obtidos da farinha de sementes de *Canna limbata*.

As frações protéicas apresentaram atividade hemaglutinante contra hemácias de coelho tratadas com enzimas proteolíticas (tripsina e papaína), o melhor resultado foi obtido quando tratado com tripsina. As lectinas de algas *Hypnea cercornis* e *Hypnea musciformis* também apresentam maior capacidade de interação quando o eritrócito estava tratado com tripsina (AINOUZ et al., 1991). Com adição de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} não houve aumento da atividade de aglutinação dos mesmos, portanto, este resultado apenas sugere que a lectina de sementes de *Canna limbata* parece não ser dependente dos cátions divalentes Ca^{2+} e Mn^{2+} para exercer sua atividade hemaglutinante. A fração 50-90 % concentrou elevado teor de proteínas solúveis ($\text{mgP} \cdot \text{gF}^{-1}$) porém apresentou uma baixa atividade específica (unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína, $\text{UH} \cdot \text{mgP}^{-1}$). Este fato está pertinente ao processo de concentração protéica ocorrido após o processo de precipitação que descarta também uma série de contaminantes não protéicos. Estes resultados indicam a especificidade da lectinas, uma vez que o efeito hemaglutinante gerado por essa proteína é dependente da estrutura molecular e estrutural de cada lectina, individualmente (SHARON & LIS, 1995) (**Tabela 4**).

Tabela 4. Tabela de Purificação da Lectina de *Canna limbata*

Frações	Proteínas Solúveis Totais (mg/mL)	Atividade Hemaglutinante (UH/mL)*	Atividade Hemaglutinante Específica (UH/mgP)#	Fator de Purificação
Extrato Total	0,390	8,0	20,51	1
Fração 50-90%	0,950	8,0	8,42	0,41
PII	0,036	32,0	888,89	43,3

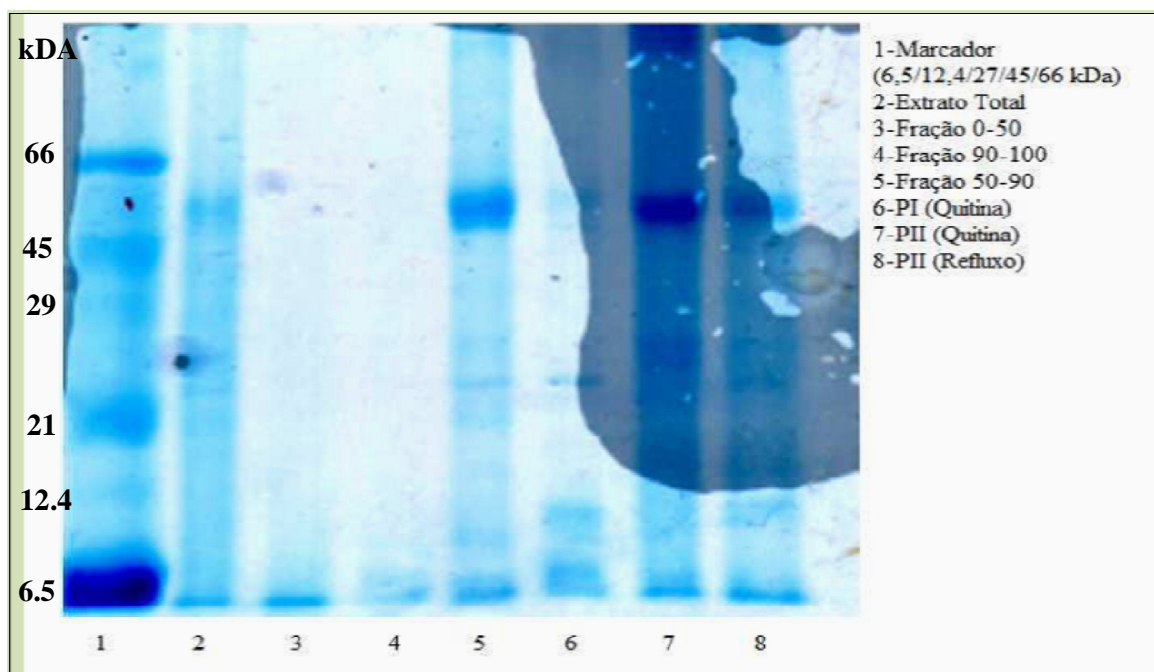
*UH – Unidade de Hemaglutinação

#mgP – Miligrama de Proteína

As frações protéicas de *Canna limbata*, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em presença de SDS e 2-mercaptoetanol. A eletroforese em gel de poliacrilamida se baseia na separação de proteína que ocorre por meio de migração diferenciada, tornando possível obter de forma aparente no ensaio a massa molecular e subunidades constituintes pela adição do SDS com ou sem 2-mercaptoetanol (KAWASGISHI et al, 2001). O SDS foi utilizado como desnaturante protéico, já que ele é um detergente anfipático. O 2-mercaptoetanol foi usado para desfazer as pontes dissulfeto, ajudando a eliminar a estrutura tridimensional dos polipeptídios. As frações apontaram um perfil protéico

muito similar com uma banda que predomina em todas as frações com massa molecular aparente em torno de 50 kDa e duas secundárias próxima à 12 e 25 kDa (**Figura 24**).

Figura 24. Eletroforese Gel de Poliacrilamida 12% em presença de SDS e 2-Mercaptoetanol. As proteínas usadas como marcadores de massa molecular foram: albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), carbonic anhydrase (bovine erythrocytes)(29 kDa), inibidor tripsina (21 kDa), citocromo C (12,4 kDa) eaprotinin (bovine lung) (6,5 kDa).



A eletroforese do pico retido da cromatografia de afinidade em coluna de quitina da lectina de sementes de *Canna limbata* apresentou uma banda adicional em torno de 12,0 kDa que pode representar a estrutura monomérica da proteína, sugere que seu arranjo biológico seja constituído por aproximadamente quatro subunidades. A análise de lectinas de monocotiledôneas sugere que existem semelhanças estruturais consideráveis, tanto na sequência de aminoácidos e processamento pós-traducional, como na organização tridimensional (VAN DAMME et al., 2007). A síntese dessas proteínas passa por um produto gênico que depois desintetizada terá seu peptídeo sinal removido e uma segunda clivagem que origina dois produtos protéicos de aproximadamente de 12 kDa que arranjam-se em dímeros e posteriormente em tetrâmeros com aproximadamente 50 kDa (HESTER et al, 1995). Deste modo, o perfil eletroforético apresentado condiz com o observado na maioria das lectinas

isoladas de espécies monocotiledonares como a lectina de *Galantus nivalis* (GNA) (FOUQUAERT et al., 2009), a principal representante desta família de lectinas.

O perfil cromatográfico mais característico pode ser notado na **Figura 24**, onde ainda pode ser observada a comparação entre os poços 7 (contato) e 8 (refluxo), onde este último proporcionou uma maior interação com a coluna de quitina.

Uma melhor observação da separação pode ser observada na **Figura 25**. A fração apresentou um pico não retido (PI) e um retido (PII) na cromatografia de afinidade em coluna de quitina ambos com atividade hemaglutinante e o mesmo perfil eletroforético.

A proteína de *Canna limbata* foi obtida com a utilização do protocolo de extração e da cromatografia de afinidade por quitina (**Figura 25**), e não apresentou interação com colunas de manose como poderia ser esperado para lectinas de monocotiledônias.

A cromatografia líquida de alta performance em coluna Mono P no AKTA na faixa de 3,0 a 7,0 apresentou um pico majoritário (**Figura 26**) antes do início do gradiente caracterizando-a como uma proteína básica, isto pode garantir uma aproximação da lectina dos enterócitos (células epiteliais absorptivas da camada superficial do intestino delgado e do intestino grosso) embora não garanta a sua absorção pela mucosa intestinal. Essa característica básica da lectina é de grande relevância para sua farmacocinética, uma vez que fármacos básicos são absorvidos preferencialmente no intestino (SOUZA et al., 2007).

Figura 25. Pico retido eluído com ácido acético em cromatografia de afinidade em coluna de quitina com refluxo. (1) Fração 50-90% da precipitação com Sulfato de Amônio. (2) Pico retido da coluna de quitina. (3) Pico majoritário da Coluna Mono P na Faixa de pH 3,0 a 7,0.

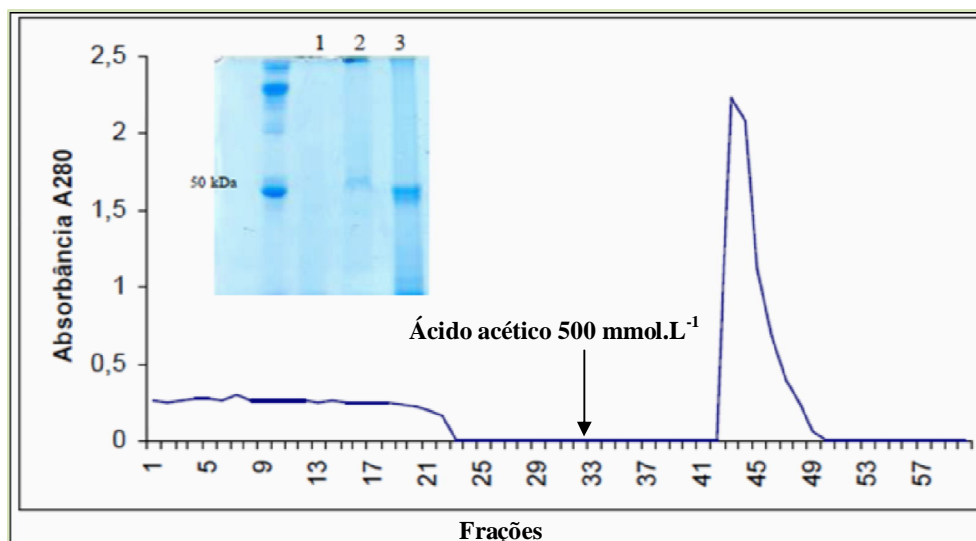
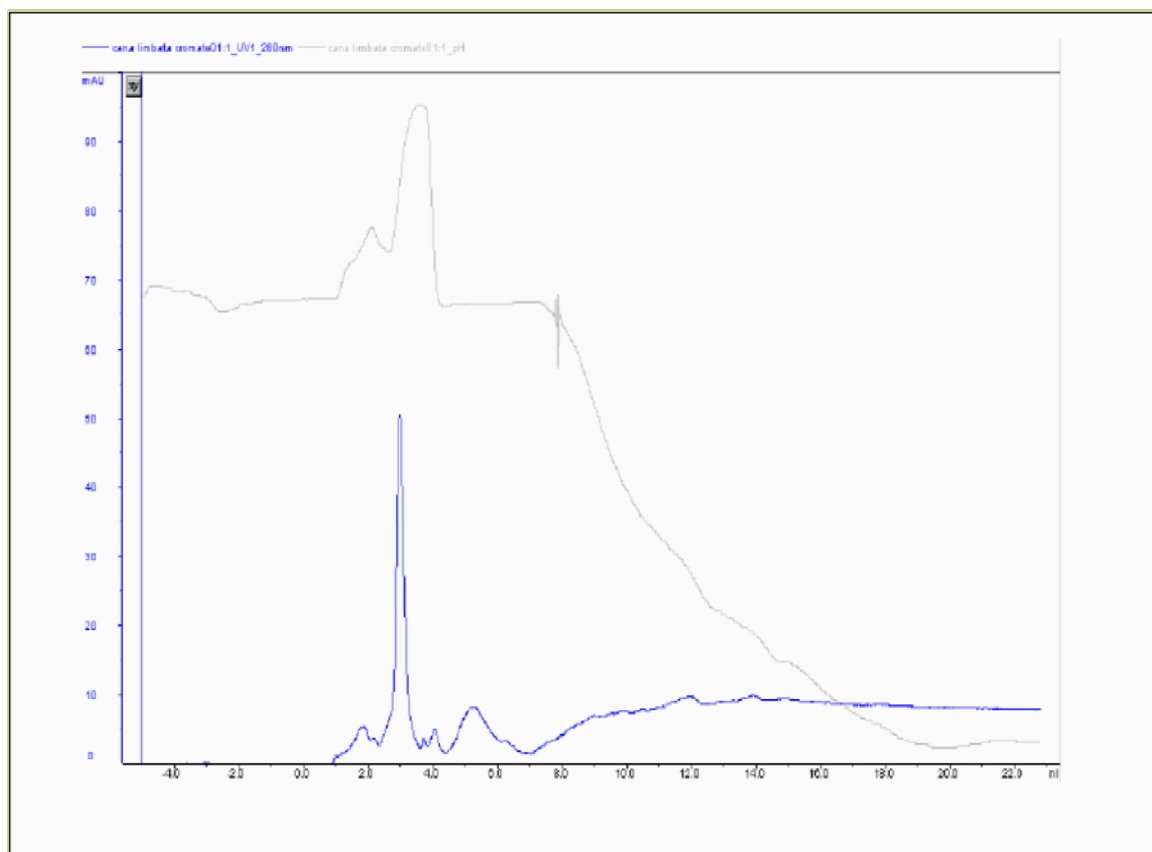
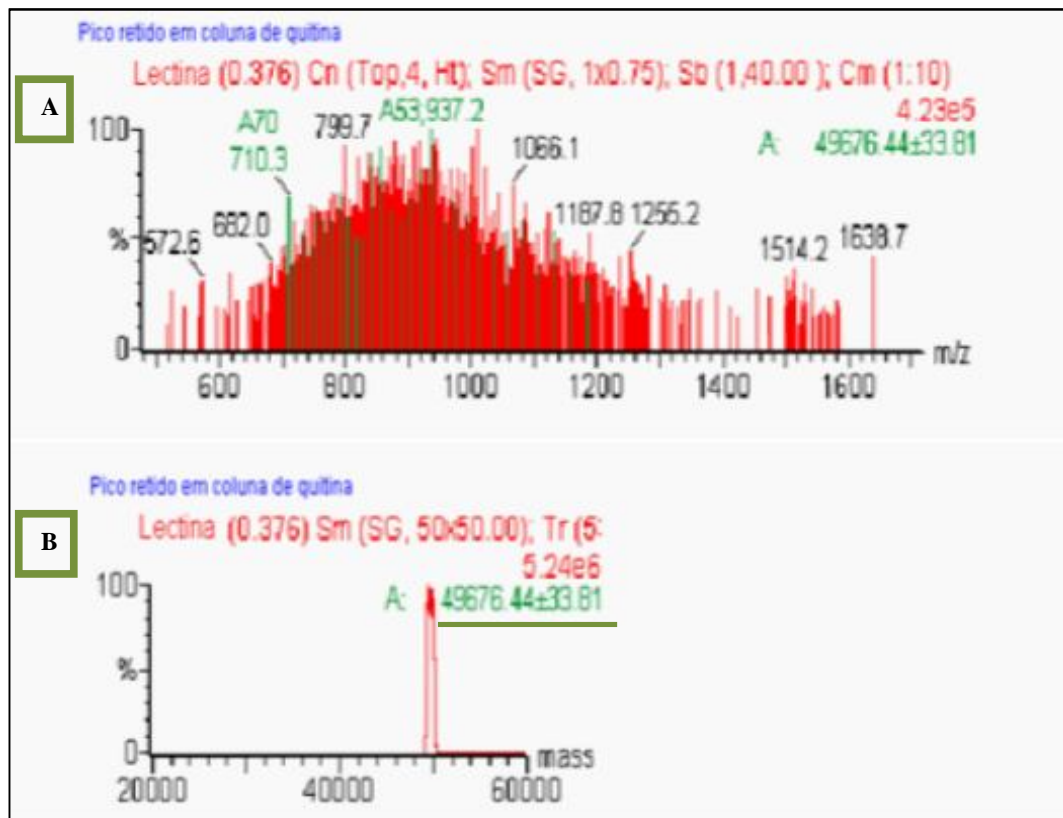


Figura 26. Cromatofocalização em Coluna Mono P na faixa de 3,0 a 7,0 em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Performance (AKTA).



Através da análise do espectro de massas da **Figura 27** foi possível notar a presença de uma proteína. O espectro é do tipo centróide com as cargas marcadas (**Figura 27A**), e na **Figura 27 B** se pode observar a deconvolução do espectro calculando a massa molecular da proteína. A massa molecular e a constituição química das lectinas é bastante variada, uma vez que elas apresentam ampla ocorrência na natureza e pelo fato de um conceito eminente funcional agrupar este tipo de proteína (CARVALHO, 1990; SOL et al., 2006). O valor de massa molecular calculado da lectina de *Canna limbata* foi 49.676 kDa. Os espectros de massa confirmam com precisão os dados das eletroforeses realizadas anteriormente. O valor de massa molecular calculado para a lectina isolada da espécie monocotiledônea *Remusatia vivípara* foi de 49, 54 kDa, esse valor condiz com o observado na maioria das lectinas isoladas de espécies monocotiledonares (BHAT et al., 2010).

Figura 27 (A e B). Espectrometria de Massas ESI-MS do pico retido da cromatografia de afinidade em coluna de quitina de sementes de *Canna limbata*. **Figura 27 A.** Espectro deconvolvido indicando massa de 49,676 kDa. **Figura 27 B.** Espectro MS multicarregado da lectina de *Canna limbata*.



A sequência N-terminal da lectina de *Canna limbata* purificada por cromatografia de troca aniônica em HPLC (**Figura 28**) foi obtida por sequenciamento de Edman. O sequenciamento de Edman consiste na leitura dos aminoácidos da extremidade N-terminal da proteína (EDMAN, 1950). Esse método foi e ainda é amplamente utilizado para identificar proteínas. Entretanto, existe uma grande limitação no emprego da química de Edman para o sequenciamento de proteínas, a leitura dos aminoácidos só pode ser efetuada se a extremidade N-terminal da proteína estiver livre. No entanto, estima-se que 50 % a 70 % das proteínas apresentam sua extremidade bloqueada, como resultado de modificações sofridas durante sua purificação (HENZEL et al., 1993). A sequência N-terminal da lectina de *Canna limbata* obtida mostrou que existem possivelmente duas cadeias na constituição da lectina (**Tabela 5**). Aparentemente essas cadeias não são monômeros idênticos e parecem estar ligados covalentemente segundo as observações das eletroforeses em condições redutoras. A digestão

com enzimas proteolíticas de sítio de clivagem específico (Tripsina, Termolisina e Quimotripsina) gerou peptídeos que foram separados e sequenciados por LC-QToFMS/MS e comparados com sequências do NCBI.

A sequência de aminoácidos de uma proteína pode ser empregada como caráter taxonômico, da mesma forma com que a sequência de nucleotídeos do DNA e do RNA é utilizada para construir relações filogenéticas. A determinação da sequência de aminoácidos oferece a oportunidade de comparação de proteínas de um amplo número de plantas (REGO, 2000).

Figura 28. Purificação da lectina de *Canna limbata* em HPLC. (a) Cromatograma da fração obtido por cromatografia de afinidade a quitina submetida à cromatografia de troca aniônica em HPLC; (b) Eletroforese do pico retido mostrado no cromatograma da lectina de *Canna limbata*.

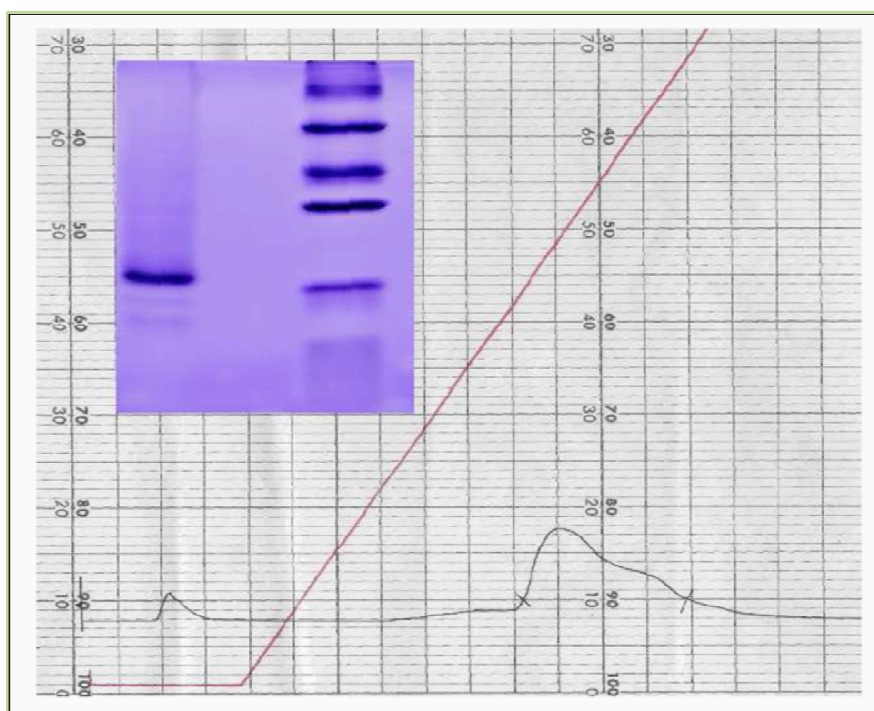


Tabela 5. Sequências N-terminais da lectina de *Canna limbata*.

Lectina de <i>Canna limbata</i>	Seqüência N-terminal
Cadeia I	DGAEGEQE (sequencia provável)
Cadeia II	PVMVDA...(sequencia provável)

A: Alanina; D: Ácido aspártico; E: Ácido glutâmico; G: Glicina; M: Metionina; P: Prolina; Q: Glutamina;
V: Valina

Estudos de similaridade de sequência entre dados obtidos do sequenciamento de peptídeos tripticos por LC-MS/MS em ESI-Q-TOF demonstraram que a lectina de *Canna limbata* apresenta similaridade com proteínas relacionadas a eventos de estresse oxidativo em *Oryzasativa* e *Arabidopsis thaliana*.

5.2 Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória da Lectina de Sementes de *Canna limbata*.

Nos últimos anos, um grande interesse tem sido demonstrado na tentativa de buscar novas substâncias com atividade analgésica e anti-inflamatória para o tratamento de vários tipos de dor.

Diversos ensaios de nociceção e inflamação em animais de laboratórios vem sendo estudados como triagem farmacológica para verificar as atividades analgésicas e anti-inflamatórias de produtos naturais, com importantes aplicações tanto na área experimental como na identificação de princípios ativos de interesse terapêutico. Deste modo, o potencial antinociceptivo de um composto pode ser avaliado pela sua capacidade de aumentar o limiar de excitação das terminações nervosas ao estímulo doloroso, ou então, fazer com que os nociceptores não percebam ou não respondam ao estímulo doloroso. Ainda que os animais submetidos a um estímulo nociceptivo não tenham habilidade de se comunicar verbalmente quando da ocorrência da dor, são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em humanos. Por isso, utiliza-se o termo “resposta nociceptiva” em vez de dor. Essas respostas comportamentais são observadas e confrontadas na presença de fármacos potencialmente analgésicos que interferem no processo fisiológico da dor, o que nos permite inferir que um animal está experimentando uma resposta alérgica (PERAZA et al., 2007).

De maneira geral, esses ensaios, apresentam particularidades que devem ser consideradas tais como simplicidade, reprodutibilidade e validade dos resultados obtidos, além disso, deve ser avaliada sua correlação com estudos clínicos (DICKESON & BESSON, 1997).

Diversos estudos têm mostrado o potencial anti-inflamatórios das lectinas de plantas (ASSREUY et al., 1997, 1999; ALENCAR et al., 1999, 2005, 2010; MOTA et al., 2006; SANTI-GADELHA et al., 2006). No entanto, raros são os estudos demonstram o potencial nociceptivo das lectinas de leguminosas (NAPIMOGA et al., 2007; NUNES et al., 2009). Já as lectinas de algas apresentam um pouco mais de estudos (VIANA et al., 2002; VIEIRA et

al., 2004; NEVES et al., 2007; BITENCOURT et al., 2008; SILVA et al., 2010; VANDERLEI et al., 2010).

O perfil antinociceptivo e anti-inflamatório da lectina de sementes de *Canna limbata* foi avaliado através dos ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético, nocicepção induzida por formalina, o ensaio da placa quente e ensaio de peritonite induzida por Zymosan A.

Os fármacos usados como controle nos ensaios foram: dipirona, indometacina e morfina.

A dipirona é um fármaco derivado da pirazolona, largamente consumido em nosso país, cuja ação terapêutica na dor e na febre já foi comprovada em vários estudos publicados. Quando administrada pela via parenteral, apresenta efeito analgésico similar aos anti-inflamatórios não esteroidais e opióides fracos (DANIELI & LEAL, 2003).

A indometacina é um fármaco analgésico e anti-inflamatório não esteroidal não específico do grupo dos ácidos indolacéticos que atua no combate da inflamação por inibir a síntese e prostaglandinas, como também inibem a motilidade dos leucócitos polimorfonucleares (ROBBERTS & MARROW, 2003).

A morfina é um fármaco o opióide de referência, no que diz respeito à potência analgésica de ação central (GOZZANI, 1994), que age inibindo diretamente a transmissão ascendente das informações nociceptivas na medula espinhal (corno dorsal) e ativando circuitos eferentes que partem do mesencéfalo e chegam ao corno dorsal da medula (GUSTEIN & AKIIL, 2003).

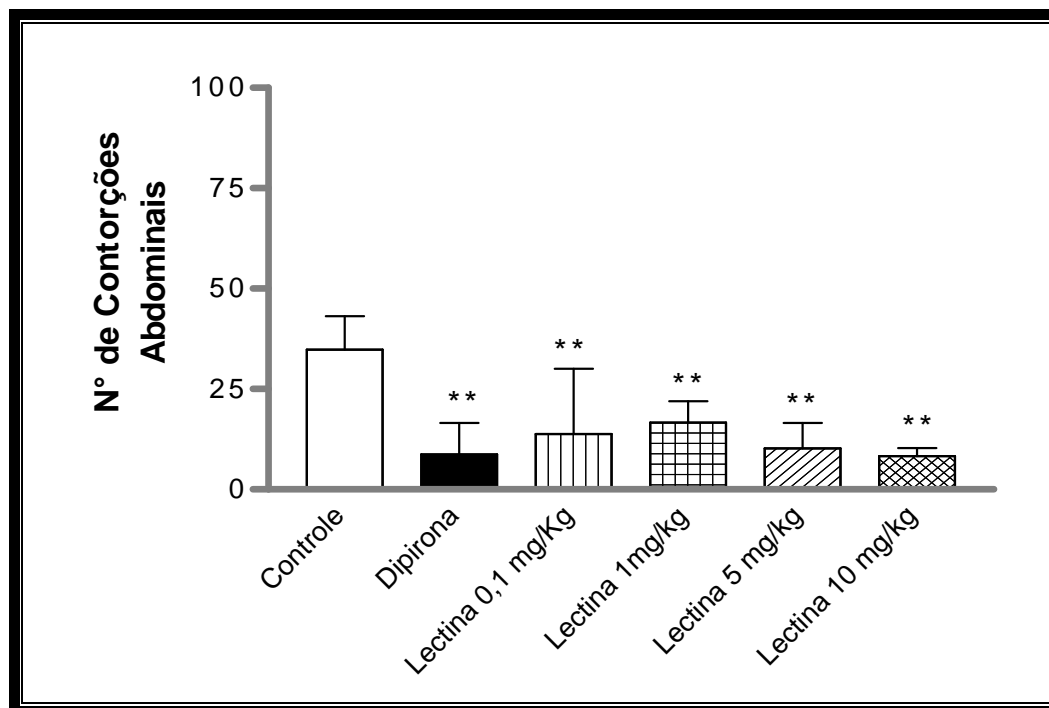
Inicialmente para avaliar o perfil farmacológico da lectina de sementes de *Canna limbata* foi realizado o ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Esse ensaio é utilizado para avaliar um possível potencial analgésico central e/ou periférico, uma vez que o ácido acético induz analgesia através da liberação de substâncias inflamatórias por macrófagos e mastócitos peritoneais, além da sensibilização das fibras sensoriais aferentes periféricas (RIBEIRO et al., 2000).

O ensaio de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é um modelo de nocicepção relativamente simples, pouco específico, mas de fácil observação, rápido e com boa sensibilidade a várias fármacos analgésicos e anti-inflamatório não esteróidais (KOSTER et al, 1959). Mesmo que não seja um ensaio específico, ele é importante porque é um método preliminar de triagem mostrando o efeito de antinocicepção geral (COLLIER et al., 1968).

Nesse ensaio, todas as doses (0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg) da lectina de semente de *Canna limbata* foram administradas por via oral, resultando em uma inibição

estatisticamente significativa (** $p < 0,01$) da resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético. Enquanto o grupo controle, tratado apenas com o veículo, apresentou $34,8 \pm 3,2$ contorções abdominais, os grupos tratados com lectinade sementes de *Canna limbata* apresentaram $13,8 \pm 6,3$ (0,1 mg/Kg), $16,8 \pm 2,0$ (1 mg/Kg), $10,2 \pm 2,5$ (5 mg/Kg) e $8,33 \pm 2,0$ (10 mg/Kg), inibindo 60,3 %, 52,1 %, 70,8 % e 76,1 % da resposta nociceptiva, respectivamente. Esses resultados são bastante satisfatórios quando comparados à inibição resultante do tratamento com dipirona (75, 2 %), que foi o fármaco padrão utilizado (**Gráfico 2**).

Gráfico 2. Efeito da lectina de sementes de *Canna limbata* (0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg, v.o) e da dipirona (40 mg/kg, v.o), no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético. Resultados expressos como média \pm e.p.m. de 6 animais, verificados por ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).



Esses dados podem ser comparados com os encontrados por Figueiredo et al. (2009) que avaliaram o efeito da lectina de sementes de *Canavalia boliviana* (i.v) sobre a contorção abdominal induzida pelo ácido acético, as lectinas inibiram as contorções abdominais de forma significativa e dose dependente em 60 %, 63 % e 64 %, nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg, respectivamente.

Diversos estudos com lectinas isoladas de algas relatam a inibição significativa das contorções abdominais e dose dependente. Viana et al. (2002) com lectinas de algas das espécies *Brythamnion seaforthii* (v.o) apresentou inibição 63 % e 53 % nas doses de 0,5 e 1mg/kg, respectivamente e *Brythamnion triquetrum* (v.o) apresentou inibição 49 % e 56 % nas doses de 5 e 10 mg/kg, respectivamente. Vieira et al. (2004) com lectinas de algas da espécie *Brythamnion seaforthii* (v.o) apresentou inibição 59 % e 71 % nas doses de 0,1 e 1 mg/kg, respectivamente. Neves et al. (2007) com lectina de algas da espécie *Amansia multifida* (v.o) apresentou inibição 39 %, 41 % e 61 % nas doses de 0,5, 1 e 5 mg/kg, respectivamente. Bitencourt et al. (2008) com lectina de algas da espécie *Hyonea cervicornis* (i.v) apresentou inibição 62 %, 42 % e 72 % nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg, respectivamente. Silva et al. (2010) com lectina de algas da espécie *Capellecea pterocladiaella* (i.v) apresentou inibição 30 %, 39 % e 52 % nas doses de 0,9, 8,1 e 72,9 mg/kg, respectivamente. Vanderlei et al. (2010) com lectina de algas da *Caulerpa cupressoides* (v.o.), apresentou inibição 37,2 %, 53,5 % e 89,0 %, nas doses de 3, 9 e 27 mg/kg, respectivamente.

Nesse modelo, a administração do ácido acético na membrana serosa pela via intraperitoneal induz nocicepção característica e um movimento estereotípico caracterizado por contrações abdominais, redução e incoordenação da atividade motora. Estes movimentos são considerados reflexos e evidenciam a dor inflamatória visceral (LE BARS et al., 2001). Isso ocorre porque o ácido acético provoca lesão tecidual e liberação de mediadores da inflamação, incluindo a bradicinina, serotonina, histamina, substância P e prostaglandinas, responsáveis pela indução do estímulo nociceptivo que pode ser bloqueados por anestésicos locais e substâncias analgésicas (LEI GUO, 2008). Além disso, acredita-se que a nocicepção induzida pelo ácido acético, depende da liberação de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-1 β e IL-8, a partir de macrófagos e basófilos residentes na cavidade abdominal e, em conjunto com outros mediadores podem induzir a nocicepção característica observada nesse ensaio (IKEDA et al., 2001).

Esses mediadores ativam nociceptores quimiossensíveis que contribuem para o desenvolvimento da dor de origem inflamatória. A lectina de sementes de *Canna limbata* foi capaz de reduzir as contorções em todas as doses testadas, sugerindo que seu efeito antinociceptivo pode estar relacionado à ação inibitória sobre a liberação de mediadores na resposta ao ácido acético, como bradicinina, serotonina, substância P e prostaglandinas, bem como citocinas.

Para melhor avaliar o perfil antinociceptivo, a lectina de sementes de *Canna limbata* foi submetida ao ensaio de nocicepção induzida por formalina. Neste modelo, a formalina

produz uma resposta bifásica distinta onde drogas analgésicas podem atuar diferentemente na primeira e na segunda fase do ensaio. Este ensaio é um modelo seguro e válido de nociceção sensível a várias classes de drogas analgésicas (MORTEZA-SEMNANI, et al., 2002). A primeira fase parece ser resultante da estimulação química direta dos nociceptores, enquanto a segunda fase é a dependente da inflamação periférica e modificações no processo central (TJØLSEN et al., 1992).

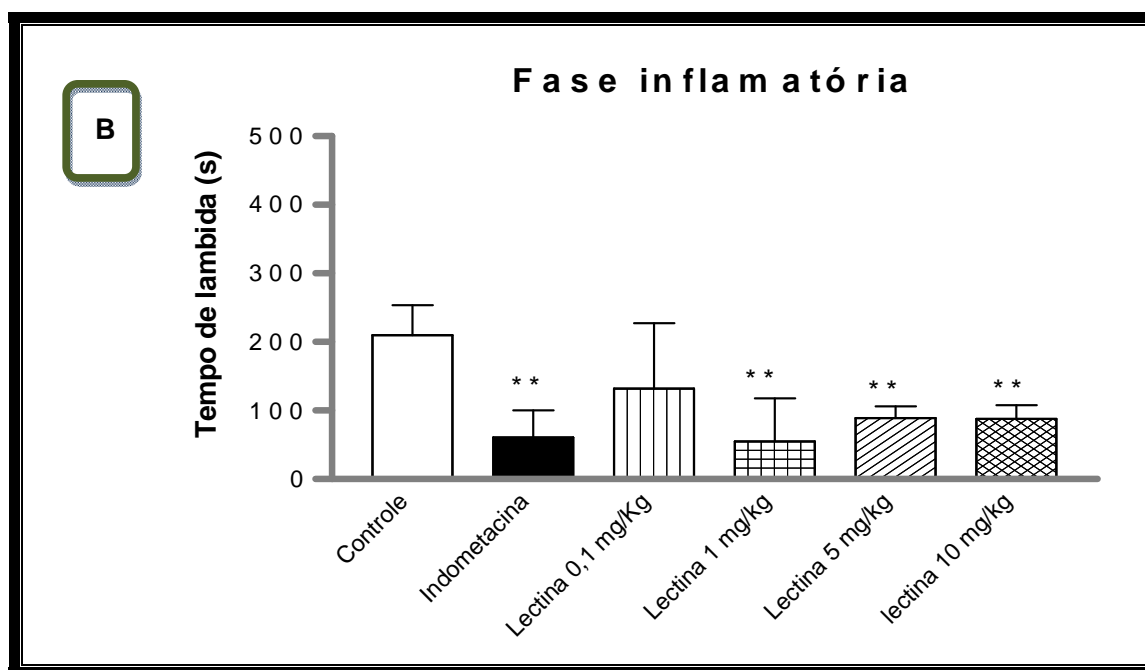
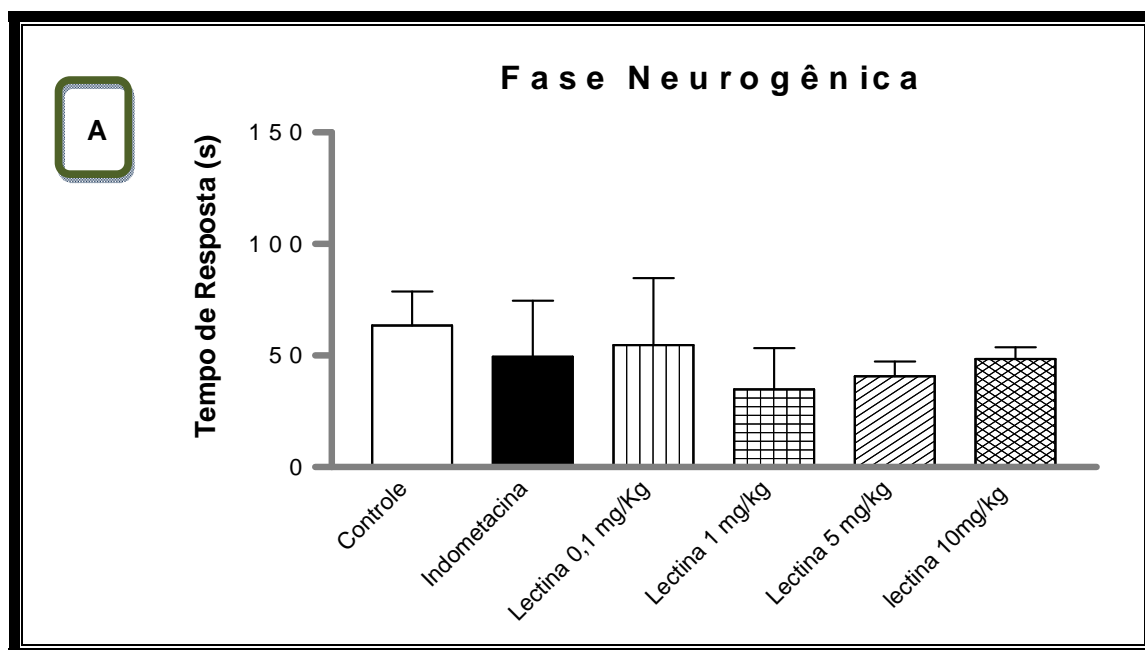
A injeção de formalina libera diferentes mediadores, como prostaglandinas, óxido nítrico, glutamato, cininas, entre outros peptídeos. No entanto, a indometacina é ineficaz contra a primeira fase dor induzida por formalina. Como se sabe os fármacos anti-inflamatórios não esteróides, que atuam inibindo a COX, são em grande parte ineficazes ou provocam inibição muito fraca na primeira fase do ensaio (HUNSKAAR et al., 1987)

Nesse ensaio, as doses (0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg) da lectina de sementes de *Canna limbata* foram administradas por via oral, na primeira fase deste ensaio, as doses da lectina não reduziram de forma significativa o tempo de lambida da pata do camundongo quando comparadas com o controle, tratado apenas com o veículo. Já na segunda fase as doses (1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg) foram capazes de inibir de forma estatisticamente significativa (**p<0,01) o tempo de lambida da pata dos animais como mostra o **Gráfico 3**.

Na primeira fase desse ensaio, o tempo que o animal passou lambendo a pata, em resposta à formalina (s.pl.), no grupo controle foi de $60,4 \pm 3,0$ s. Esse tempo não foi reduzido após o tratamento com as doses da lectina de sementes de *Cana limbata* (**Gráfico 3A**). Esta é a fase neurogênica, que é altamente sensível aos agentes opióides (HUNSKAAR et al., 1987). Podendo sugerir que lectina de sementes de *Cana limbata* não possui efeito nociceptivo central.

Na segunda fase do ensaio o grupo tratado apenas com o veículo gastou $209,6 \pm 15,9$ s lambendo a pata em resposta à formalina, enquanto que o tratamento com as doses da lectina de sementes de *Cana limbata* reduziu esse tempo de forma estatisticamente significativa para $55,0 \pm 22,58$ s (1 mg/Kg), $89,0 \pm 17,1$ s (5 mg/Kg) e $87,9 \pm 19,7$ s, inibindo 73,8 %, 57,6 % e 96,02 %, respectivamente. A dose da lectina de 0,1 mg não reduziram de forma significativa o tempo de lambida da pata do camundongo quando comparadas com o controle, tratado apenas com o veículo. A indometacina, fármaco utilizado como padrão induziu uma inibição de 97,25 % na segunda fase do ensaio (**Gráfico 3B**).

Gráfico 3 (A e B). Perfil antinociceptivo da lectina de sementes de *Canna limbata* (0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg) e da indometacina (35,7 mg/kg) por administração v.o. no ensaio de nocicepção induzida por formalina. O painel A representa a fase neurogênica do teste (1ª fase) e o painel B a fase inflamatória (2ª fase). Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais por grupo (* $p < 0,05$ ** $P < 0,01$ no teste ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).



A maioria dos estudos demonstram que as lectinas apresentam efeitos antinociceptivo periférico, ou seja, elas agem na dor inflamatória (NAPIMOGA et al., 2007; BITENCOURT et al., 2008 e NUNES et al., 2009). Nos estudos de Viana et al. (2002); Vieira et al. (2004) e Neves et al. (2007) apesar das lectinas apresentarem ambas as fases efeito inibição significativa, a segunda fase predominou. No entanto, Figueiredo et al. (2009) e Vanderlei et al. (2010) demonstraram efeitos significativos tanto na antinocicepção neurogênica como na antinocicepção inflamatória de forma significativa.

A fase neurogênica (1ª fase) envolve a estimulação direta dos nociceptores e liberação de substância p e a fase inflamatória (2ª fase) envolve a liberação de serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandinas (TJØLSEN et al., 1992; GAETNER et al., 1999). Nesta última fase, mediadores químicos diferentes são envolvidos: os aminoácidos excitatórios, neuropeptídeos, óxido nítrico e cininas (MALMBERG & YAKSH, 1995; TJØLSEN & HOLE, 1997).

Fármacos que atuam primariamente como analgésicos de ação central, como opióides (por exemplo, a morfina), inibem a dor em ambas as fases do ensaio. No entanto, a segunda fase também é sensível a fármacos que atuam periféricamente, como anti-inflamatórios não esteroidais e por corticosteróides (como, por exemplo, a dexametasona) (SHIBATA et al., 1989).

Neste ensaio, a lectina de sementes de *Cana limbata* inibiu somente a segunda fase, sugerindo que o efeito antinociceptivo das lectinas está relacionado à dor inflamatória. Provavelmente a diminuição do tempo de latência poderia ser explicada pelo efeito inibidor da lectina sobre a biossíntese e/ou liberação e/ou ação dos responsáveis pelos mediadores da inflamação, tal como sugerido em outros estudos (NAPIMOGA et al., 2007; BITENCOURT et al., 2008; NUNES et al., 2009 e FIGUEIREDO et al., 2010).

Para avaliar o perfil antinociceptivo central da lectina de sementes de *Canna limbata* foi utilizado o modelo de placa quente ($54 \pm 1^\circ \text{C}$). Este ensaio é eficiente em revelar a atividade de analgésico opióide (LE BARS et al., 2001). Nesse ensaio, as doses 0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg foram administradas por via oral. Neste ensaio, todas as doses da lectina que foram avaliadas, não foram capazes de aumentar de forma estatisticamente significativa o tempo de permanência do animal sobre a placa quando comparado ao grupo controle, tratado apenas com veículo, ao contrário da morfina (4,3 mg/kg, s.c.), utilizado como fármaco padrão, causou um aumento significativo no tempo de latência dos animais colocados sobre o estímulo térmico da placa nos tempos de 60 e 90 minutos ($6,9 \pm 1,4\text{s}$ e $6,8 \pm 1,1\text{s}$), como já era de esperar se tratando de um analgésico opióide (**Tabela 6 e Gráfico 4**).

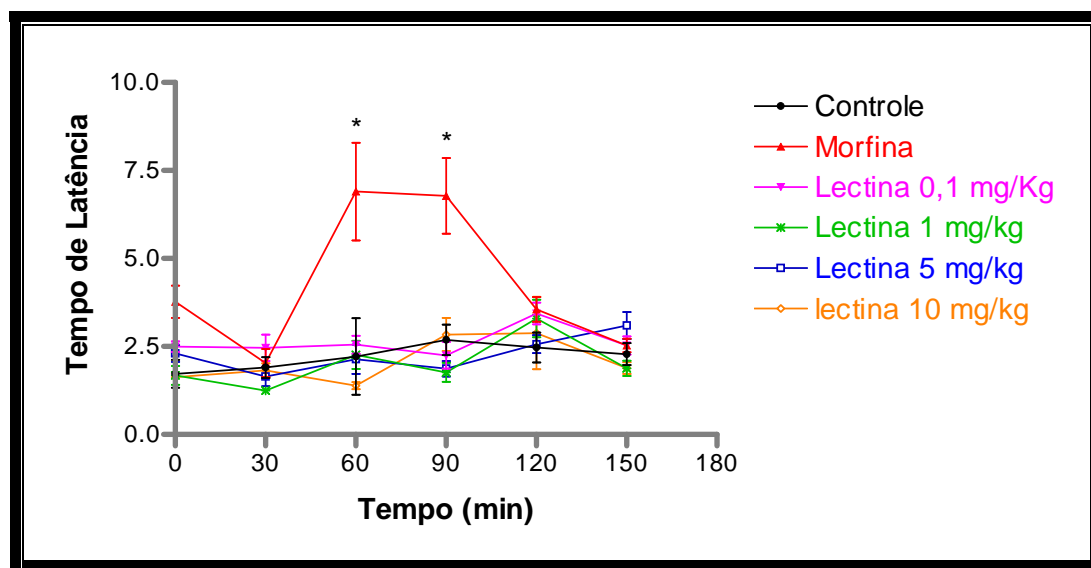
Tabela 6. Perfil antinociceptivo central da lectina de sementes de *Canna limbata* (0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg, v.o.) e da morfina (4,3 mg/kg, s.c.) no ensaio de placa quente (n=6). Tempo em segundos que o animal permaneceu sobre a placa aquecida (54±1 °C).

Tratamento	Pré-tratamento (min) ^a			Pós- tratamento (min) ^a		
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
Veículo (controle)	1,7±0,4	1,9±0,3	2,2±1,1	2,7±0,4	2,5±0,4	2,3±0,4
Morfina	3,8±0,4	2,0±0,4	6,9±1,4*	6,8±1,1*	3,6±0,4	2,5±0,2
Lectina 0,1 mg/Kg	2,5±0,1	2,5±0,4	2,6±0,3	2,2±0,4	3,4±0,3	2,5±0,3
Lectina 1 mg/Kg	1,7±0,7	1,3±0,1	2,3±0,4	1,8±0,3	3,3±0,5	1,9±0,2
Lectina 5 mg/Kg	2,3±0,2	1,6±0,3	2,1±0,4	1,9±0,2	2,6±0,3	3,1±0,4
Lectina 10 mg/Kg	1,6±0,04	1,8±0,2	1,4±0,1	2,8±0,5	2,9±1,02	1,9±0,2

^aResultados expressos em média ± e.p.m. de 6 animais por grupo.

*p< 0, 05 (ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).

Gráfico 4. Perfil antinociceptivo central da lectina de sementes de *Canna limbata* (0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg, v.o.) e da morfina (4,3 mg/kg, s.c.) no ensaio de placa quente (n=6). Tempo em segundos que o animal permaneceu sobre a placa aquecida (54±1 °C). (* P<0,05 no teste ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).



O ensaio de placa quente é usado para avaliação de dor no nível supra-espinal (MARCHIORO et al., 2005). A resposta produzida pelo estímulo nocivo é rápida, sendo mediada pela ativação dos nociceptores, o impulso é conduzido ao corno dorsal da medula espinal e posteriormente para os centros corticais, da mesma forma agem agentes opióides que exercem efeitos analgésicos via receptores espinal e supra espinal (NEMIROVSKY et al., 2001). A resposta observada neste ensaio resulta da ativação direta de nociceptores térmicos cutâneos que transmitem informação nociceptiva aguda a regiões específicas no SNC. A integração do estímulo ocorre devido à estimulação de fibras C não-mielinizadas de condução lenta, produzindo uma resposta nociceptiva organizada (LE BARS et al., 2001).

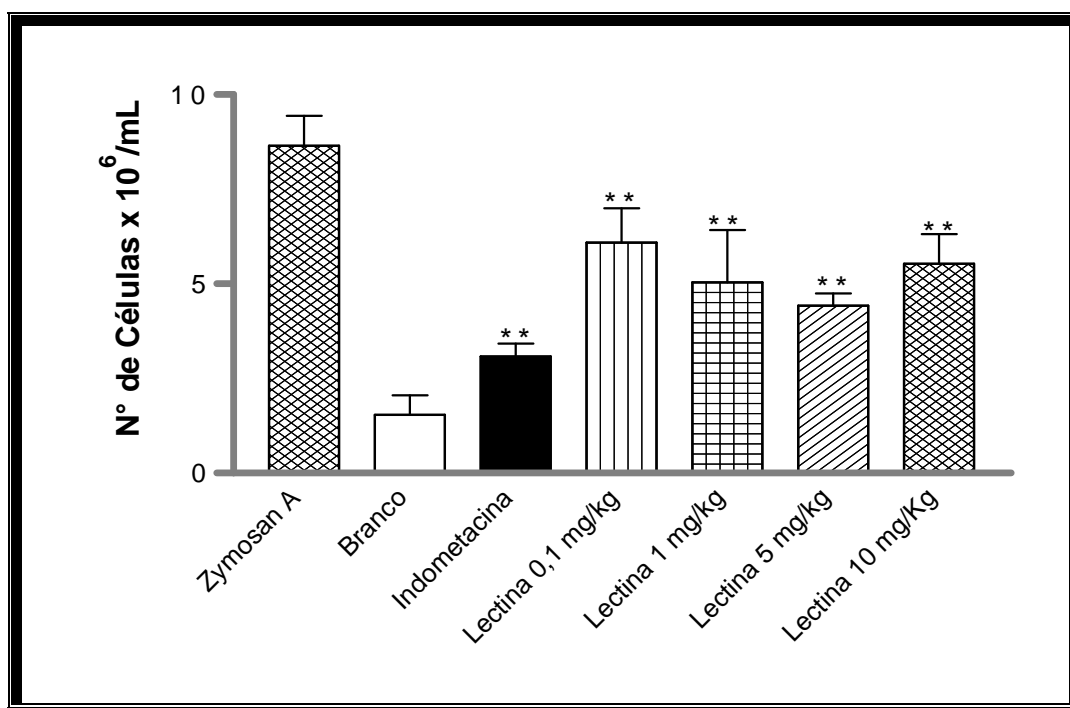
Embora, este ensaio seja frequentemente usado para avaliar analgésicos narcóticos, outras substâncias com atividade central, incluindo os sedativos e relaxantes musculares têm demonstrado atividade neste ensaio (EDDY & LEIMBACH, 1953). Em contraste, como os efeitos da morfina, a indometacina e outros anti-inflamatórios não esteroidais, não demonstram efeitos inibitórios significativos na nocicepção térmica (SANTOS et al., 1998).

Os resultados obtidos por Bitencourt et al (2008) com lectina de algas da espécie *Hyonea cervicornis* (i.v) e por Silva et al. (2010) com lectina de algas da espécie *Capellecea pterocladiaella* (i.v) demonstram que as lectinas não foram capazes de aumentar de forma estatisticamente significativa o tempo de permanência do animal sobre a placa. No entanto, os estudos realizados por Viana et al. (2002) com lectinas de algas das espécies *Brythamnion seaforthii* (v.o) e *Brythamnion triquetrum* (v.o), Vieira et al. (2004) com lectinas de algas da espécie *Brythamnion seaforthii* (v.o), Neves et al. (2007) com lectina de algas da espécie *Amansia multifida* (v.o) e Vanderlei et al. (2010) com lectina de algas da *Caulerpa cupressoides* (v.o.), demonstram que as lectinas aumentaram de forma estatisticamente significativa o tempo de permanência do animal sobre a placa e que possivelmente estão envolvidas no sistema opióide. Portanto, concluir-se que existem lectinas que apresentam somente efeitos antinociceptivos periféricos, como também lectinas que apresentam tanto efeitos antinociceptivos periféricos, como centrais.

As doses 0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg da lectina de sementes de *Canna limbata* não induziram um aumento do tempo de latência dos animais na placa quente, sugere que esta não apresenta atividade antinociceptiva central em receptores opióides, portanto, a atividade antinociceptiva desta lectina está relacionada aos efeitos anti-inflamatórios periférico, ou seja um perfil de ação mais próximo aos anti-inflamatórios não esteroidais. Estes resultados reforçam os achados no ensaio de nocicepção induzida por formalina, onde não apresentou perfil antinociceptivo na fase neurogênica.

Como a lectina de sementes de *Canna limbata*, apresentou atividade significativa nos ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético e na segunda fase (inflamatória) do ensaio de nocicepção induzida por formalina, foi avaliada também sua atividade anti-inflamatória para verificar uma possível inibição do recrutamento celular induzida pela lectina, utilizando o ensaio de peritonite induzida por zymosan A. Os animais controle positivo (injetados com Zymosan A, sem tratamento) apresentaram um aumento do número de leucócitos (média \pm E.P.M.) de $8,65 \pm 3,1 \times 10^6$ células/mL. Os resultados obtidos nesse experimento mostram que todas as doses (0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg) da lectina foram capazes de reduzir a migração celular de forma estatisticamente significativa (** $p < 0,01$) após seis horas da administração de Zymosan A, com inibição de 29,68% (0,1 mg/Kg), 41,74% (1 mg/Kg), 48,90% (5 mg/Kg) e 43,74% (10 mg/Kg), quando comparados ao grupo controle que recebeu apenas a Zymosan A (**Gráfico 5**). Nesse ensaio a indometacina, utilizada como fármaco padrão inibiu 64,36% da migração celular para a cavidade peritoneal.

Gráfico 5. Efeito da lectina de sementes de *Canna limbata* (0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg, v.o.) e da indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) , no ensaio de peritonite induzida por Zymosan A em camundongos. Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais por grupo (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ no teste ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).



A peritonite é uma condição inflamatória caracterizada por ativação nos sistemas de cascata (complemento, coagulação, cininas e fibrinólise), nas células (endotélios, leucócitos e monócitos) e pela liberação de mediadores (radicais livres do oxigênio, histamina, eicosanóides, fatores de coagulação e citocinas) (TEITAUM, 2006). Durante esse processo ocorre uma exarcebação no transporte desolutos entre o plasma e a membrana porosa, além da produção paralela demigração celular. Essas alterações devem-se pela vasodilatação dos capilares namembrana peritoneal e pela abertura dos poros nos microvasos, causados pormediadores celulares e inflamatórios, como neutrófilos e prostaglandina E₂, respectivamente (PAULINO et al., 2008).

O ensaio de peritonite tem por finalidade avaliar a migração leucocitária, por meio da contagem total de leucócitos, que são liberados durante o processo da inflamação aguda. Esse método ocorre após a inoculação do agente flogístico via administração intraperitoneal. A inflamação pode ser induzidapor diversos agentes flogísticos, como por exemplo, carragenina, *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), tiogliconato de sódio, bradicinina, substância P, Zymosan A, entre outros, que pode atinge seu pico de 4 à 6 horas. O agente flogístico utilizado nesse estudo foi o Zymoza A.

Há diversos motivos pelos quais o fluido peritoneal do camundongo serconsiderado um excelente material para o estudo de leucócitos extravasculares. Primeiro, o número de células livres do fluido peritoneal ser totalmente constante em camundongos não estimulados, mesmo que mudanças rápidas e dramáticas na população celular possam ocorrer por causa da manipulação experimental, o sistema se reequilibra e a população celular tende a retornar as medidas normais. Deste modo, o fluido peritoneal dos camundongos parece estar sob controle de mecanismos homeostáticos. Segundo, substâncias injetadas intraperitonealmente evocam primariamente uma resposta celular local. Terceiro, o camundongo parece depender mais de fatores celulares do que humorais. Além disso, o fluido peritoneal do camundongo não estimulado contém poucos neutrófilos, isso pode ajudar a detectar e medir o influxo de qualquer número de células (FRUHMANN, 1964).

O Zymosan A é um polissacarídeo constituinte da parede celular do fungo *Sacharomyces cerevisiae* capaz de induzir a degranulação de mastócitos, liberando aminas vasoativas como serotonina e histamina, e ainda pode gerar produtos do metabolismo do ácido araquidônico e ativar a via alternativa do sistema do complemento. Quando administrado na cavidade peritoneal do camundongo induz um aumento no extravasamento vascular manifestada pelo influxo de leucócitos inflamatórios, um dos sinais preliminares da inflamação (BOUGHTON-SMITH & GHELANI, 1995; RAO et al., 1994). Este é um passo

importante na formação do exsudado inflamatório e é seguido por um tempo dependente de recrutamento de células, sobretudo neutrófilos. O edema é resultante do extravasamento de proteínas plasmáticas induzido por aminas vasoativas (histamina) e eicosanóides (prostaglandinas da série E₂) (DOHERTY et al., 1985; LEITE et al., 2007).

Bitencourt et al. (2008) demonstrou que a lectina de algas da espécie *Hyonea cervicornis* (i.v) foi capaz reduzir a migração celular de forma estatisticamente significativa (*p<0,05), com inibição de 55 %, 81 % e 90 % nas doses de 0,1; 1 e 10 mg/kg, respectivamente, utilizando como agente flogístico a carragernina e com inibição de 72 %, 78 % e 83 % nas mesmas doses, utilizando como agente flogístico o *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). Silva et al. (2010) com a lectina de algas da espécie *Capellecea pterocladiaella* (i.v) foi capaz reduzir a migração celular de forma estatisticamente significativa (*p<0,05), com inibição de 84 % na dose de 8,1 mg/kg, utilizando como agente flogístico a carragernina. Vanderlei et al. (2010) com lectina de algas da *Caulerpa cupressoides* (v.o.), foi capaz reduzir a migração celular de forma estatisticamente significativa (*p<0,05) nas doses de 9 mg/kg, utilizando como agente flogístico a carragenina. Alencar et al. (2010) com lectina de sementes de *Luetzelburgia auriculata* foi capaz reduzir a migração celular de forma estatisticamente significativa (*p<0,05) nas doses de 2 mg/kg (i.v), utilizando como agente flogístico a carragenina.

Posteriormente a indução da inflamação peritoneal nos camundongos, as doses 0,1 mg/Kg; 1 mg/Kg; 5 mg/Kg e 10 mg/Kg da lectina de sementes de *Canna limbata* reduziram a migração leucocitária, 6 horas depois da administração do agente flogístico Zymosan A quando comparadas ao controle positivo. Esses dados confirmam os resultados obtidos anteriores nos ensaios de contorção induzida por ácido acético e nocicepção induzida por formalina. Sugerindo que a lectina de sementes de *Canna limbata* pode desempenhar atividade anti-inflamatória, provavelmente, por inibição da migração celular dos leucócitos para cavidade peritoneal, devido à produção de substâncias quimiotáticas e/ou a inibição da expressão de moléculas de adesão.

O tratamento pela via oral e seu consequente efeito indicam que a lectina de sementes de *Canna limbata* são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal, visto que as lectinas apresentam alta estabilidade, boa resistência à digestão enzimática no trato gastrointestinal (inclusive em meio ácido) (POCHEL & IRACHE, 1998).

Com base, nos dados obtidos no presente estudo demonstram que a lectina de sementes de *Canna limbata* apresentam atividade antinociceptiva periférica com perfil anti-inflamatório. Portanto, este estudo pode sugerir uma aplicabilidade biotecnológica para as

lectinas como substâncias úteis na compreensão do processo da inflamação e da dor com o intuito de alcançar novos alvos terapêuticos.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste estudo mostram o isolamento e a purificação da lectina de sementes de *Canna limbata*, indicando um protocolo para a obtenção da lectina em quantidades suficientes para os estudos estruturais e biológicos posteriores. Uma caracterização prévia da molécula indica uma proteína tetramérica (~50kDa) constituída de subunidade de aproximadamente 12 kDa. Os aspectos estruturais indicam uma lectina semelhante às demais lectinas reconhecidas de manose purificadas de monocotiledôneas, embora apresente uma especificidade por açúcar diferenciada. Essa lectina também é classificada como hololectina.

No estudo da atividade antinociceptiva da lectinade sementes de *Canna limbata*, administrados pela via oral nas doses de 0,1 mg/kg; 1mg/kg, 5 mg/kg e 10 mg/kg, apresentou atividade antinociceptiva noensaio de contorção abdominal induzida por ácidoacético. No ensaio de nocicepção induzida por formalina esta atividade ocorreu somente na segunda fase doses de 1mg/kg, 5 mg/kg e 10 mg/kg, sugerindo uma ação da lectina na fase inflamatória, e este achado é reforçado pela ausência do efeito antinociceptivo central no ensaio de placa quente. Na investigação da atividade anti-inflamatória, desta lectina sobre a fase inflamatória da dor, foi comprovada pela inibição da migração celular no ensaio de peritonite induzida por Zymosan A.

Como perspectiva está sendo isolada uma maior quantidade da lectinade sementes de *Canna limbata*, para que sejam submetidos aos ensaios de inibição da atividade hemaglutinante, obtenção da estrutura tridimensional por cristalografia de raios x, determinação da dose inibitória de 50% (DI_{50%}) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético, ensaio de toxicidade e possíveis mecanismos de ação dessa lectina.

Dessa forma, a espécie *Canna limbata*, trata-se de uma espécie promissora para a obtenção destas proteínas para possíveis utilizações no tratamento da inflamação e da dor, sendo necessários mais estudos *in vivo* e *in vitro*, para avaliação de mecanismo de ação e toxicidade.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGAPOV, I. I.; TONEVIST, A. G.; MALUCHENKO, N. V.; MOISENOVICH, M. M. BULAH, Y. S.; MIKHAIL, P.; KIRPICHNIKOV, M. P. Mistleto e lectin A-chain unfolds during the intracellular transport. **Febs Letters**, v. 469, p. 63-66, 1999.
- AINOUZ, I.L.; SAMPAIO, A.H.; BENEVIDES, N.M.B.; FREITAS, A.L.P.; COSTA, F.H.F.; CARVALHO, M.R. & JOVENTINO, F.P. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algae. **Botanica Marina**, v.35 475-47, 1992.
- ALENCAR, N. M. N.; ASSEREUY, A. M. S.; HAVT, A.; BENEVIDES, R. G.; MOURA, T. R.; SOUSA, R. B.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q. e CAVADA, B.S. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) Lectin Activates Cultured macrophages to Release Chemotactic Mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology**, v. 374, p. 275-282, 2007.
- ALENCAR, N. M. N.; CAVALCANTE, C. F.; VASCONCELOS, M. P.; LEITE, K.B.; ARAGÃO, K. S.; ASSEREUY, A. M. S.; NOGUEIRA, N. A. P.; CAVADA, B.S. e VALE, M. R. Antiinflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.57, p. 912 - 922, 2005.
- ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, R. S. B.; FIGUEIREDO, J. G.; CAVALCANTE, I. J. M.; MATOS, M. P. V.; CUNHA, F. Q.; NUNES J. V. S.; BOMFIM, I. R e RAMOS, M. V. An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. **Inflammation Research**, v. 56, p. 245-254, 2010.
- 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, n. 2, p. 107-113, 1999.
- ALENCAR, N.M.; ASSREUY, A.M.; ALENCAR, V.B.; 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 Biochememistry Cell Biology**, v. 35, n. 12, p. 1674-81, 2003.

ALENCAR, N.M.; ASSREUY, A.M.; CRIDDLE, D.N.; SOUZA, E. P.; SOARES, P.M.; HAVT, A.; ARAGÃO, K.S.; BEZERRA, D.P.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. *Vaitarea macrocarpa* induces paw edema with leucocyte infiltration. **Protein & Peptide Letters**, v. 11, n. 2, 195-200, 2004.

ALMEIDA, T. F.; ROIZEMBLATT, S.; TUFIK, S. Afferente pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, p. 40-56, 2004.

ALONSO, A.A e MORAES-DALLAQUA, M. A. Morfoanatomia do sistema caulinar de *Canna edulis* Kerr-Gawler (Cannaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.2, p.229-239, 2004.

ALONSO, A. A.; MORAES-DALLAQUA, M. A.; MENEZES, N. L. Endoderme com atividade meristemática em raiz de *Canna edulis* Kerr-Gawler (Cannaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 18, n. 3, p.693-699, 2004.

AMBROSI, N.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycacose. **Organic Biomolecular Chemistry**, v. 3, p. 1593-1608, 2005.

ANURADHA, P.; BHIDE, S. V. An isolectin complex from *Trichosanthes anguina* seeds. **Phytochemistry**, v. 52, p. 751-758, 1999.

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

ASSEREUY, A. M. S.; MARTINS, G. J.; MOREIRA, M. E. F.; BRITO, G. A. C. CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R. A. e FLORES, C. A. Prevention of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins.**Journal of Urology**, v. 161, p.1988-1993, 1999.

ASSREUY, A. M. S.; CALVETE, J. J.; ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S.; ROCHA-FILHO, D. R.; MELO, S. C.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. **Biology of Reproduction**, v. 67, n.6, p. 1796-1803, 2002.

BALZARINI, J.; NEYTS; SCHOLS, D.; HOSAYA, M.; VAN DAME, E.; PEUMANS, W; DE CLERCQ, E. The manose-specific plant lectin from *Cymbridium hybridand* and *Epipacts helleborine* and the (n-acetylglucosamine)_n-specific plant lectin from *Urtica diocla* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and Cytomegalovirus replication in vitro. **Antiviral Research**, v. 18, p. 191-207, 2002.

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. **Immunol Invest**, v. 21, n. 4, p. 297-303, 1992.

BASBAUM, A.I.; JESSEL, T.M. Percepção da Dor. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. **Princípios da Neurociência**, 4 ed., São Paulo, Manole, p. 472-491, 2004.

BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Toward better pain control. **Scientific American**, v. 294, n. 6, p. 60-67, 2006.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BENJAMIN, C.F., FIGUEIREDO, R.C., HENRIQUES, M.G.M.O., BARGA-FIDALGO, C. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.873-881, 1997.

BELITZ, H. D. WEDER, J. K. P. Protein inhibitors of hydrolases in plantas foodstulfs. **Food Reviews International**, v. p. 151-211, 1900.

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

BERRY, F.; KRESS, W.J. *Heliconia*: an identification guide. 1.ed. Smithsonian Institution Press, 1991. 333p.

BESSON, M. J.; DICKESON, A. The pharmacology of pain. **Berlim: Springer-Verlag**, v. 30, p.21-41, 1997.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p 1610-1615, 1999.

BEVILACQUA, M. P.; NELSON, R. M. Selectins. **Journal Clinical Investigation**, v.91, p. 379 – 387, 1993.

BHANDARI, P., BATEMAN, A.C., MEHTA, R.L.; PATEL, P. Mucosal expression of cyclooxygenase isoforms 1 and 2 is increased with worsening damage to the gastric mucosa. **Histopathology**, v. 46, n. 3, p. 180-186, 2005.

BHAT, G. G.; SHETTY, K. N.; NAGRE, N. N.; NEEKHRA, V. V.; LINGARAJU, S.; BHAT, R. S.; INAMDAR, S. R.; SUGUNA, K.; SWAMY, B. M. Purification, characterization and molecular cloning of a monocot mannose-binding lectin from *Remusatia vivipara* with nematocidal activity. **Glycoconjugate Journal**, v. 27, p. 309-320, 2010.

BITENCOURT, F. S.; FIGUEIREDO, J. G.; MOTA, M. R. L.; BEZERRA, C. C. R.; SILVESTRE, P. P., VALE, M. R.; NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, A. H.; NAGANO, C. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R. L.; CAVASDA, B. S.; ASSREUY, A. M. S. EALENCAR, N. M. N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 377, p. 139-148, 2008.

BOI, C.; CATTOLI, F.; FACCHINI, R.; SORCI, M.; SARTY, G. C. Adsorption of lectin on affinity membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 273, p. 12 – 19, 2006.

BOUGHTON-SMITH, N. K.; GHELANI, A. Role of induced nitric oxid synthase and increased NO levels in zymozan peritonitis in the rat. **Inflammation Research Supplement**, n.2, p. 149-150, 1995.

BRADFORD, M. A. A rapid and sensitive methods for quantitation of microrgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

BRASZIKIN, A.; BOISSONNADE, M.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; CARVALHO JR, L. B.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. *Cratylia mollis* lectin the aqueous solution interface: adsorption and lectin-lipid interactions. **Colloides and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 17, p. 1991-2001, 2000.

BUTERA, A. P. & SOUZA-FILHO, J. P. Síntese de amins e sulfonamidas de β -D-galacropiranosilamina e β -lactosilamina e avaliação de suas interações com lectinas de *Erythrina cristagalli* e de *Ricinas communis*. **Química Nova**, v. 30, p. 1267-1274, 2007.

CAILLIET, R. **Dor: mecanismo e tratamentos**. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul LTSD, p. 274-284, 1993.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v.33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. BEIRITH, A.; FERREIRA, J. ; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Natural occurring antinociceptive substances from plants. A review. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 1-18, 2000.

CALVETE, J. J.; THOLE, H. H.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M.V.; ROCHA, I.M. A.; GUIMARÃES, F. N.; CAVADA, B.S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1430, p. 367-375, 1999.

CARVALHO, H. F. Aspectos moleculares e biológicos das lectinas. **Ciência e Cultura**, n.42, p. 884 - 893, 1990.

CASTRO, C.E.F. Inter - relações das famílias das Zingiberales. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.1, n.1, p.2-11, 1995.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETO, M. Revisiting *proteus*: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptides Science**, v. 2, p. 1-13, 2001.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; SOUSA, F. A. M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v. 49, n.3, p. 675-680, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; CAMPOS, F.; CORRÊA, F.; YUNES, R. A.; NUNES, R. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão de literatura. **Química nova**, v. 26, n. 2, p. 230-241, 2003.

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

COLLIER, H. O.; 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, n. 2, p. 295-310, 1968.

COLLINS, T. Inflamação Aguda e Crônica. In: ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6^o ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CONTRAN; R. S.; ROBBINS, S. L. **Patologia Estrutural e Funcional**. Guanabara, 6^o ed., 2000.

COOLIER, 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, n. 2, p. 285-310, 1968.

COOLINGE, D.B., KRAGH, K.M., MIKKELSEN, J.D., NIELSEN, K.K., RASMUSSEN, U., VAD, K. Plant chitinases. **Plant Journal**, v. 3, p. 31-34, 1993.

DANIELI, P. & LEAL, M. B. Avaliação da segurança da dipirona: uma revisão.

Revista Brasileira de Farmacia, v. 84, n.1, p.17-20, 2003.

DAVIS, B.G. Recentes developments in glycoconjugates. **Journal Chemical Society Perkin Transaction**, v. 1, p. 3215-3217, 1999.

DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; SOUZA, E. P.; OLIVEIRA, T. M.; BEZARRA, G.A.; MORENO, F. B.; FREITAS, B. T.; SANTI-GADELHA, T.; SAMPAIO, A.H.; AZEVEDO JR, W.F.; CAVADA, B.S. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Structural Biology**, v. 7, p. 52, 2007.

DICKENSON, A. & BESSON, J. M. **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer. 1997.

DJOUHRI, L; LAWSON, S. N. Ab-fiber nociceptive primary afferent neurons A-fiber neurons in mammaes. **Brain Research Reviews**, v. 46, p. 131-145, 2004.

DOHERTY, N. X; POUBELLE, P.; BORGEAT, P.; BEAVER, T. H.; WESTRICH, G. L.; 89 SCHRADER, N. L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, p. 769-789, 1985.

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyland dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, p. 385-393, 1953.

EDMAN, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. **Acta Chemical Scandinavica**, v. 4, p. 283-293, 1950.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal Pharmacology**, v. 110, p. 1227, 1993.

FIGUEIREDO, J. G.; BITENCOURT, F. S.; BESERRA, I. G.; TEXEIRA, C. S.; LUZ, P. B.; BEZERRA, E. H. S.; MOTA, M. R. L.; ASSEREUY, A. M. S.; CUNHA, F. Q. CAVADA, B. S. e ALENCAR, N. M. N. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from

Canavalia boliviana seeds in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, p. 407 – 414, 2009.

FOUQUAERT, E.; SMITH, D.F.; PEUMANS, W.J.; PROOST, P.; BALZARINI, J.; SAVVIDES, S.N. & VAN DAMME, E.J. Related lectins from snowdrop and maize differ in their carbohydrate-binding specificity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 380, p. 260-265, 2009.

FRUHMANN, G. J. Extravascular mobilization of neutrophils. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 113, p. 968-1002, 1964.

GABIUS, H. J. Non-carbohydrate binding partners/domains of animal lectins. **International Journal Biochemistry**, v. 26, p. 469-477, 1994.

GABIUS, H. J.; ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; SIEBERT, H-C. The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, n.2-3, P. 165 - 177, 2002.

GADELHA, C.A.A., MORENO, F.B.M.B., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J.B., ROCHA, B.A.M., ASSREUY, A.M.S., MOTA, M.R.L., PINTO, N.V., MEIRELES, A.V.P., BORGES, FREITAS, B.T., CANDURI, F., SOUZA, E.P., DELATORRE, P., CRIDDLE, D.N., DE AZEVEDO, W.F. JR., CAVADA, B.S. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **Journal of Structural Biology**, v. 152, p. 185-194, 2005.

GAERTNER, M.; MULLER, L.; ROOS, J. F.; CANI, G.; SANTOS, A. R. S. NIERO, R.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; DELLE-MANACHE, F. e CECHINEL-FILHO, V. Analgesic triterpenes from *Sebastiania Schottiana* roots. **Phytomedicine**, v.6, p. 41-44, 1999.

GALEGO DEL SOL, F.G; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A. H.SANZ, L.; CALVETE, J. J. Lectins. **Investigación Y Ciencia**, v. 361, p. 258-267, 2006.

GATEHOUSE, A. M. R.; BARBIERI, L.; SLUPE, F.; CROY, R. R. D. Effects of ribosome inactivating proteins on insect development-differences between Lepidoptera and Coleoptera. **Entomology Experimentalis Applicata**, v. 54, p. 43-51, 1990.

GOMES, J.C.; FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with *Concanavalin A*. **Agents Actions**, v. 41, n. 3-4, p. 132-5, 1994.

GOZZANI, J. L. Opióides e antagonistas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 44, n. 1, p. 65-73, 1994.

GRIS, P.; GAUTHIER, J.; CHENG, P.; GIBSON, D. G.; GRIS, D.; LAUR, O.; PIERSON, J.; WENTWORTH, S.; NACKLEY, A. G.; MAIXNER, W.; DIATCHENKO, L. A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor: functional antagonism. **Molecular Pain**. v. 6, p. 33, 2010.

GUSTEIN, H. B. & AKIIL, H. Analgésicos opióides. In Goodman and Gilman. **As bases Farmacológicas da Terapêutica**, 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

HENZEL, W., BILLECI, T. M., STULTS, J. T., WONG, S. C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence data bases. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 90, n. 11, p. 5011-5015, June 1993.

HESTER, G.; KAKU, H.; GOLDSTEIN, I.J. & WRIGHT, C.S. Structure of mannose specific snow drop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. **Nature Structural Biology**, v. 2, p.472-479, 1995.

HUA, S.; CABOT, P. J. Mechanisms of peripheral immunecell-mediated analgesia in inflammation: clinical and therapeutic implications. **Cell**, v. 31, p. 427-433, 2010.

HUNSKAR, S.; FAMER, O. B. HOLE, K. Formalin test in mice, a useful techique for evaluating mild analgesia. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69-76, 1987.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory pain. **Pain**, v.30, n. 1, p. 103-114, 1987.

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

JI, R. R.; STRICHARSTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Science**, v. 252, p. 1-19, 2004.

JIMBO, M.; YANOHARA, T.; KOIKE, K.; KOIKE, K.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. The D-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 125, n. B, p. 227-236, 2000.

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

KAUR, A.; SING, J.; KAMBOY, S. S.; SEXANA, A. PANDITA, R. M.; SHAMNUGAVEL, M. Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1933-1940, 2005.

KAWASGISHI, H. TAKAGI, J. TAIRA, T. MURAT, T. USUI, T. Purification of a lectin from the mushroom *Mycocleptosdonoides aichisonii*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 53-58, 2001.

KENNEDY, J. F.; PALVA, P. M. G.; CORELLA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versátil e proteins of recongnition: a review. **Carbohydrate polymers**, v. 26, p.219-230, 1995.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overwieu. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1572, p. 187-197, 2002.

KOMATH, S. S.; KAVITHA, M.; SWAMY, M. J. Beyond carbohydrate binding: new direction in plant lectin research. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 4, p. 973-988, 2006.

KOSTER, R.; ANDERSON, M. e DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation proceedings journal**, v. 18, p. 412, 1959.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Bases Patológicas das Doenças**. 7^o ed. Rio de Janeiro. Elsevier, p. 1504, 2005.

KURASHI, Y. Involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algescic tests. **Brain Research**, v. 273, n. 2, p. 245-252, 1983.

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

LE BARS, D.; GOZARIUM, M; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Review of Pharmacology**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LEI GUO, CAIYING YE, WENYING CHEN, HUA YE, RU ZHENG, JUAN LI, HUIFEN YANG, XIAOLI YU, DECHANG ZHANG. Anti-inflammatory and analgesic potency of carboxyamidotriazole, a tumoristatic agent. **American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 2008.

LEITE, D. F. P.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; FERREIRA, S. C.; CALIXTO, J. B.; RUMJANEK, V. M. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, p. 630-637, 2007.

LIS, H. & SHARON, N. Affinity chromatography for the purification of lectins (a review). **Journal of Chromatography**, v. 215, p. 361-372, 1981.

LIS, H. & SHARON, N. Carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.

LIU, B.; PENG, H.; YAO, Q.; LI, J.; DAMME, E. V.; BALZARINI, J.; BAO, J - K. Bioinformatics analyses of the mannose-binding lectins from *Polygonatum cyrtonea*, *Ophiopogon japonicus* and *Liparis noversa* with antiproliferative and apoptosis-inducing activities. **Phytomedicine**, v. 16, p. 601-608, 2009.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochemica et Biophysica**, v. 1572, p. 198-208, 2002.

LORIS, R., VAN WALLE, I., DE GREVE, H., BEECKMANS, S., DEBOECK, F.; WYNS, L., BOUCKAERT, J. Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 5, p. 1227-1240, 2004.

MAAS, M.; KAMER, V.; MAAS, P J. M. The Cannaceae of the World. **Blumea**, v.52, p. 247-318, 2008.

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.

MALBERG, A. B. e YAKSH, T. L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **Journal of Neuroscience**, v.15, n.4, p.2768-2776. 1995.

MARCHIORO, M., BLANK MDE, F., MOURAO, R.H., ANTONIOLLI, A.R., Antinociceptive activity of aqueous extract of Erythrina velutina leaves. **Fitoterapia**, v. 76, p. 637-642, 2005.

MARQUES, J. O. Dor: diagnostic e tratamento. **Base da Anatomia e Fisiopatologia**. São Paulo: Âmbito Editora, v. 1, n. 1, abr/mai/jun, 2004.

MARTINEZ-CRUZ, M.; ZENTENO, E.; CÓRDOBA, F. Purification and characterization of a galactose specific lectin from cor (Zeam mays) coleoptyle. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1568, p. 37-44, 2001.

MAZUMBER, U. K.; GUPTA, M.; MANI KANDAN, L. BHATTACHARYA, S.; HALDAR, P.K.; ROY, S. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vernonia cinerea* Less. extract in rats. **Phytomedicine**, v. 10, p. 185-188, 2003.

MEDZHITOV, V. R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**. v. 140, p. 771-776, 2010.

MELO-JÚNIOR, M. R.; ARAÚJO-FILHO, J. L. S.; PATU, V. J. R. M.; MOCERADO, M.C. F. P.; BELTRÃO, E. I. C.; CARVALHO-JÚNIOR, L. Análise digital de imagens de

neoplásias da pele avaliadas pela histoquímica com lectinas: marcador potencial para alterações bioquímicas e diagnóstico diferencial de tumores. **Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, 2006.

MELZACK, R.; LOESER, J. SD. Pain: an overview. **Pain**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

MENEZES, R. A. Neuroanatomofisiologia da dor. In: MENEZES, R. A. (org). **Síndrome Dolorosas – Diagnóstico – Terapêutico – Saúde Física e Mental**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, p. 9-19, 1999.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 164, 1999.

MITCHELE, R. N.; KUMAR, V; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Fundamentos de Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 7° ed. Rio de Janeiro. Elsevier, p. 800, 2006.

MOREIRA, R.A.; CASTELO-BRANCO, C.C.; MONTEIRO, A.C.O.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L.M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. Seeds. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1183-1188, 1998.

MORTEZA-SEMNANI, K.; SALEDI, M. HAMIDIAN, M.; VAFAMEHR, H.; DEHPGUR, A.R. Anti-inflammatory, analgesic activity and toxicity of *Glaucium grandiflorum* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 181-186, 2002.

MOTA, M. R. L.; CRIDDLE, D.S. N.; ALENCAR, N. M. N.; GOMES, R. C.; MEIRELES, A. V. P.; SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A. A.; OLIVEIRA, C. C.; BENEVIDES, R. G.; CAVADA, B.S. e ASSEREUY, 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, n. 1, p. 1-10, 2006.

MURDOCK, L.L.; SHADE, R.E. Lectins and Protease Inhibitors as Plant Defenses against Insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6605 - 6611, 2002.

NAPIMOGA, M. H.; CAVADA, B.S; ALENCAR, N. M.; MOTA, M. L.; BITENCOURT, F. S.; ALVES-FILHO, J. C.; GRESPAN, R. B.; GONÇALVES, R. B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; DE FREITAS, A.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H. E CUNHA, F.Q. *Lonchocarpussericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 824-835, 2007.

NEMANN, D.; LEHR, C. M.; LEHOF, H. P. KOHLBACHER, O. Computational modeling of the sugar lectin interaction. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p. 437-457, 2004.

NEMIROVSKY, A.; CHEN, L.; ZELMA, V. B. e JURNA, I. The antinociceptive effect of the combination of morphine with systemic morphine or buprenorphine. **Anesthesia & Analgesia**, v. 93, p. 197-203, 2001.

NEVES, S.A.; FREITAS, A.L.; SOUSA, B.W.; ROCHA, M.L.; CORREIA, M.V.; SAMPAIO, D.A.; VIANA, G.S. Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 127-134, 2007.

NIV, D.; KREITLER, S. Pain and Quality of Life. **Pain Practice**, v. 1 p. 150-161, 2001.

NUNES, B. S.; RESONNET, N. S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S. M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H.; MOURA, T. R.; TEIXEIRA, E. H.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; CUNHA, F. Q. e NAPIMOGA, M. H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology**, v. 379, p. 609-616, 2009.

OITA, S.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; NAGATA, T. **Binding of Barley and Wheat α -Thionins to Polysaccharides**. 2000.

OLIVEIRA, M. L.; BELTRANINI, L. M.; DE SENONE, S. G.; BRUMANO, M. H. N.; SILVA-LUCCA, R. A.; NAKAEMA, M. K. K.; PIRES, C. V. E OLIVEIRA, M.G. A. Purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia tinctoria* Domb. ex DC fruit. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 15, n. 2, p. 119-122 2003.

OLSNES, S.; KOZLOV, J. V. Rincin. **Toxicon**, v. 39, p. 1713-1728, 2001.

ONG, C. K. S.; LIRK, P.; TAN, C. H.; SEYMOUR, R. A. An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Clinical Medicine & Research**, v. 5, n. 1, p. 19-34, 2007.

PARK, R.; KIM, M. S.; SO, H. S.; JUNG, B. H.; MOON, S. R.; CHUNGF, S. Y.; KO, C. B.; KIM, B. R.; CHUNG, H. T. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK 1) in mistletoe lectina I induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1685-1691, 2000.

PARK, K. A.; VASKO, M. R. Lipid mediators of sensitivity in sensory neurons. **European Journal of Pharmacology**, v.26, n. 11, p. 571-577, 2005.

PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA D.; NAGASAWA H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ W. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**.p. 1-6, 2008.

PEUMANS, W. J.; BARRE, A., HAO, Q., ROUGÉ, P., VAN DAMME, E. J. M. Higer plants developed structurally different motifs to recognize for eignglycans. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v.12 n. 64, p. 83-101, 2000.

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 Genetic Engineering Review**, v. 15, p. 199-229, 1998.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A. e ROUGÉ, P. Classification of plant lectins in structurally an evolutionary related proteins. **Molecular Immunology of Complex Carbohydrates**, 27-54, 2001.

PERAZA, G. G.; RODRIGUES, S. T.; MEDEIROS, S. H. L.; MUCCILLO-BAISCH, A. L. O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. **Vitalle**, v. 19, n. 1, p.35-44, 2007.

PIZON, R. P. et al. Lectina ligadora da manose: propriedades, isolamento e purificação. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.9, n.2, Jul. - Dez./2008.

PONCHEL, G. AND IRACHE, J. M. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 191-219, 1998.

PRADO, P.T.C.; DEL BEL, E. A. *C-fos*, na immediate early gene as a neuromaker for nociception. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, p. 424-433, 1998.

PUSZTAI, A. Plant lectins. Cambridge University Press, Cambridge, 1991.

PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. **Trends in Glycoscienceof Glycotechnology**, v. 8. p. 149-165, 1996.

QUIOCHO, F. A. Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. **Annual Review Biochemistry**, v. 55, p. 287-315, 1986.

RAINVILLE, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 122, p. 195-204, 2002.

RANKIN, J. A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clinical Issues**, v. 15, p. 3-17, 2004.

RANG, H.P; DALE, M. M; RITTER, J. M.; FLOWER, R.J. Hormônios locais, inflamação e alergia. In: RANG, HP; DALE, MM; RITTER, JM.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**, 6° ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007.

RAO, T. S., CURRIE, J. L., SHAFTER, A. F., ISAKSON, P. C. In vivo characterizations of zymozan-induced mouse peritoneal inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 269, n.3, p. 917-925, 1994.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of amulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. Syringae pvmori*. **Plant Science**, v.160, p.739-744, 2001.

REGO, E. J. L.; CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (Smooth rattlebox). **Phytochemistry**, v. 6, p. 441-446, 2002.

RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S.H. IL-8 cause in vivo neutrophil migration by a cell dependent mechanism. **Immunology**, v. 73, p. 472 - 477, 1991.

RIBEIRO, M. N. O.; PAIVA, P. D. O. Bananeirinha. Disponível em: <<http://www.floresnaweb.com/dicionario.php?id=217>>. Acesso em: 07 de Janeiro de 2011.

RIBEIRO, R. A.; SOUZA-FILHO, M. V. P.; SOUZA, M. H. L. P.; OLIVEIRA, S. H. P.; COSTA, C. M.S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S.H. P. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 112, p. 27-35, 1996.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; TOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. e CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymozan and acetic acids in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 37, p. 111 – 118, 2000.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception pain, and antinociception: current concepts. **Rheumatology**, v. 60, n. 6, p. 404-415, 2001.

RINI, J. M. Lectin structure. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 24, p. 551-577, 1995.

ROBBIS, S. L, COTRAM, R. S.; KUMAR, V. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.

ROBBIS, S. L, COTRAM, R. S.; KUMAR, V. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROBBERTS, L. J. & MORROW, J. D. Analgesico-Antipiréticos, agentes antiinflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota. In Goodman and Gilman. **As bases Farmacológicas da Terapêutica**, 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.531p.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA, L.. Dor: Aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

ROCHA, B. A. M.; DELATORRE, P.; OLIVEIRA, T. M.; BENEVIDES, R. G.; PIRES, A. F.; SOUZA, A. A. S.; SOUZA, L. A. G.; ASSEREUY, A. M. S.; DEBRAY, M. H.; AZEVEDO, W. F.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Structural basis for both pro- and anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*. **Biochimie**, v. 93, p. 806-816, 2011.

RUDIGER, H. e GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate journal**, v.18, p. 589-613, 2001.

RUDIGER, H. Plant lectin - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica**, v.161, p. 130-152, 1998.

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, n. 4, p. 1050-55, 2006.

SANTOS, A.R.S.; VEDANA, E.M.A.; FREITAS, G.A.G. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research**, v. 47, p. 302-307, 1998.

SANTOS, A. F. S.; ARGOLO, A. C. C.; COELHO, L. C. B. B. e PAIVA, P. M. G. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa leifera* seeds. **Water Research**, v. 39, p. 975-980, 2005.

SANTOS, J. L.; BLAW, L.; MENEGON, R. F.; OLIVEIRA, H. P.; BUELONI, R. H.; BOFFO, E.; MACHADO, R. G. P.; LONGO, M. C.; CHUNG, M.C. Síntese e modelagem molecular do novo derivado indolinônico como candidato a anti-inflamatório COX-2 seletivo. **Journal of Basic and Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 2, p. 238-240, 2007.

SANZ-APARÍCIO, J.; HERMOSO, J.; GRANJEIRO, T. B. e CAVADA, B. S. The crystal structure of *Canavalia brasilensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct lectin biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v. 405, p. 114-118, 1997.

SCHOR, N.; BOIM, M. A.; SANTOS, O. F. P. **Medicina Celular: bases moleculares da biologia, da genética e da farmacologia**. Editora Atheneu, São Paulo, 2003.

SELL, A. M.; COSTA, C.P. Efeito inflamatório local induzido pelas lectinas PHA, WGA e jacalina. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 6, n. 1, p.47-52, 2002.

SHARON, N., LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**, v. 268, p. 82-89, 1993.

SHARON, N., LIS, H. LECTINS. Chapman and Hall, London, p.127, 1989.

SHARON, N., LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-64R, 2004.

SHARON, N., LIS, H. Lectins. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, das selectinas. **Netherlands**, 2003.

SHARON, N. & LIS, H., (1995). Lectins-proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. In: Apps, D.K., Tipton, K.F. (Eds.), *Essays in Biochemistry*, vol. 30. Portland Press, London, p. 59-75.

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

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-52, 1989.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUZA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F.S. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 16, p. 38-43, 2000.

SILVA, L. M. C. M.; LIMA, V.; HOLANSDO, M. L.; PINHEIRO, P. G.; ROSDRIGUESJ. A. G.; LIMA, M. E.P. e BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 5, p. 830-835, 2010.

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

SKOPURA, L. A.; VIEIRA, R. F. Coleta de germoplásma de plantas medicinais. In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTE, T. D. (org). **Fundamentos para coleta de germoplásma vegetal**. Brasília: Emprapa/ Cenargem, 2004

SOUZA, C. D.; FEOFINI, J. A. Uso de plantas medicinais na região de alto paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 515-527, 2007.

STIRPE, F., BATTELLI, M.G. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.63, p. 1850-1866, 2006.

SUN, J.; WANG, B.; GUO, Z.; LIU, M.; JEANG, K. Purification and characterization of natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus setiferus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 27, p. 292-299, 2007.

STROUL, N. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 39-41, 2000.

SWANSON, M. D.; WINTER, H. C.; GOLDSTEIN, I. J.; MARKAVITZ, D. M. A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 12, 2010.

TEDGUI, A.; MALLATE, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circulation Research**, v.11, p. 877-878, 2001.

TEITEAUM, I. Cloudy peritoneal dialysate. It's not always infection. **Contributions to Nephrology**, v. 150, p. 187 – 194, 2009.

TJØLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: in evaluation of the method. **Pain**, v.51, n.1, p.5-17, 1992.

TJØLSEN, A. e HOLE, K. Animal models of analgesia. In: Dickenson, A.; Besson, J. (eds) *The pharmacology of pain*, v. 130. Springer Verlag, Berlin, p. 1–20, 1997.

TOMS, G. C. Lectin leguminosae. In: *Advances in legumes* (POWEHILL, R. M. & RAVEN, P. H. eds). **Royal Botanic Garden, Kew**.1981.

TRACEY, I.; MANTYH, P.W. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. **Neuron**, v. 55, p. 377-391, 2007.

TRIGUEIROS, V.; LOUGARRE, A.; ALI-AHMED, D.; RAHBÉ, Y.; GUILLOT, L.C.; FOURNIER, D.; Paquereau, L. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of new pesticidal protein. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1621, p. 292-298, 2003.

VAN DAMME, E.J.M., CULERRIER, R., BARRE, A., ALVAREZ, R., ROOUGE, P., PEUMANS, W.J.: A novel family of lectins evolutionarily related to class V chitinases: an example of neofunctionalization in legumes. **Journal of Plant Physiology**, v.144, p. 662-672, 2007.

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

VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; FOUQUAERT, E.; PEUMANS, W. J. The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. **Glycoconjugate Journal**, v. 20, P. 449-460, 2004.

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

VANE, J. R.; BOITING, R. M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Scandinavian Journal Rheumatology**, v. 25, p. 9-21, 1996.

VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development?. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 116-137, 2006.

VIANA, G.S.B.; FREITAS, A.L.P.; LIMA, M.M.L.; VIEIRA, L.A.P.; ANDRADE, M.C.H.; BENEVIDES, N.M.B. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G.Gmel.) M. Howe. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 713-722, 2002.

VIEIRA, L. A. P.; FREITAS, A. L. P.; FEITOSA, J. P. A.; SILVA, D. C. e VIANA, G. S. B. The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1071 – 1079, 2004.

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

WOODLEY, J. F. Lectins for gastrointestinal targeting – 15 years on. **Journal of Drug Targeting**, v. 7, n. 5, p. 325-333, 2000.

YAN, A.; YANG, Z.; DENG, W. HAN, L. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, v. 442, p. 72-81, 2005.



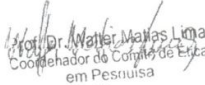
YUEN, C.T. et al. Relationships between the N-glycan structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures. **British Journal of haematology**, v. 121, p. 511-526, 2003.

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

ZENTENO, R.; VAZQUEZ, L.; SIERRA, C.; PEREYRA, A.; SLOMIANNY, M. C.; BOUQUELET, S.; ZENTENO, E. Chemical characterization of the lectin from fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) by MALDI-TOF. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 125, n. B, p. 243-250, 2000

ZIMMERMAN, M., Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. **Pain** 16, 109-10, 1983.

ANEXO A - Folha de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

	
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	
Maceió – AL, 03/12/2010	
Senhor (a) Pesquisador (a), Bruno Anderson Matias da Rocha Eliane Aparecida Campesatto Mella Theolyta Santos de Araújo	
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 29/11/2010 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 015102/2010-51 sob o título Purificação e Caracterização das Atividades Algicas e Endomatogênica de Lectinas de Sementes de <i>Canna limbata</i> e <i>Canna glauca</i>, vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.</p>	
<p>O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).</p>	
<p>É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.</p>	
<p>Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).</p>	
<p>Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.</p>	
<p>Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.</p>	
<p>Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.</p>	
<p>(*) Áreas temáticas especiais</p>	
 Dr. Walter Matias Lima Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa	