

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia

SANDRO DO NASCIMENTO SILVA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PREPARAÇÕES LECTÍNICAS DA FOLHA
DE *Caesalpinia ferrea*: AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS

Recife

2009

SANDRO DO NASCIMENTO SILVA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PREPARAÇÕES LECTÍNICAS DA FOLHA
DE *Caesalpinia ferrea*: AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, área de glicoproteínas, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos
Correia

Recife – 2009

Catálogo na Fonte:

Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Silva, Sandro do Nascimento

Purificação e caracterização de preparações lectínicas da folha de *Caesalpinia ferrea*: avaliações biológicas / Sandro do Nascimento Silva. – Recife, 2009.

68 f. : il.

Orientadoras: Maria Tereza dos Santos Correria, Teresinha Gonçalves da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2009.

Inclui referências e anexos

1. Proteínas 2. Lectinas I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Silva, Teresinha Gonçalves da (coorient.) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-478

SANDRO DO NASCIMENTO SILVA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PREPARAÇÕES LECTÍNICAS DA FOLHA
DE *Caesalpinia ferrea*: AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, área de glicoproteínas, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em 15/12/2009

Comissão examinadora:

Prof^a Dra. Maria Tereza dos Santos Correia – Presidente
(Universidade Federal de Pernambuco)

Prof^a Dra. Vera Lucia de Menezes Lima – 1º examinador
(Universidade Federal de Pernambuco)

Prof^a Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho – 2º examinador
(Universidade Federal de Pernambuco)

Prof^a Dra. Teresinha Gonçalves da Silva – 3º examinador
(Universidade Federal de Pernambuco)

“Ter fé é acreditar nas coisas que você não vê;
a recompensa por essa fé é ver aquilo em que você acredita.”

Agostinho

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua bondade em me conceder a alegria de realizar meus sonhos e pela força que só Ele pode me dar nas horas difíceis.

Aos meus pais (Elena e José Antonio), orientadores da minha vida, que me instruíram o caminho correto com toda sabedoria que Deus lhes deu.

A minha Irmã (em memória) que até esse ano pôde me fortalecer com seu sorriso inocente e seu abraço aconchegante.

A Rhizia pela força e pelo carinho cedidos constantemente. É um prazer poder escolher você como minha esposa, desejo viver a minha vida inteira ao seu lado.

A Andrea pela colaboração nas pesquisas e amizade no dia a dia de trabalho.

A Dra e amiga Neila Ximenes, por toda atenção incentivo e ensinamentos dedicados.

A Prof^a Dra. Maria Tereza dos Santos Correia pela orientação e por todo apoio nas pesquisas e no desenvolvimento profissional.

A Prof^a Dra. Teresinha Gonçalves da Silva pela ajuda nas pesquisas e o apoio nas dúvidas e ensinamentos de uma área que eu não dominava.

A todos do laboratório de glicoproteínas pela amizade e companheirismo.

A todos do laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos pelo acompanhamento prestado e mão amiga nas horas de necessidade.

Ao secretário do Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Djalma Gomes pela colaboração e apoio.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho

A CNPq por ter financiado e apoiado esse trabalho, sem a qual não teria sido possível sua execução.

RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam de forma reversível e específica a carboidratos. Devido a essa característica principal elas têm sido uma importante ferramenta da biotecnologia, sendo utilizada em diversos ramos da pesquisa. Lectinas da folha da *Caesalpinia ferrea* (CfeLL) foram purificadas e juntamente com seu extrato bruto (EB) foram caracterizados e avaliados quanto ao seu potencial analgésico, antiinflamatório e antitumoral utilizando camundongos fêmeas. A pesquisa partiu do interesse em explorar a *C. ferrea*, uma planta com muitas propriedades terapêuticas utilizada pela medicina popular. Inicialmente obteve-se o extrato bruto a 10% de solução em Tampão citrato fosfato 10mM pH 6,5. Com uma amostra do extrato foi feita cromatografia em coluna de quitina. CfeLL aglutinou eritrócitos de coelhos e de humanos e teve sua atividade inibida por glicoproteínas (fetuína e soro fetal bovino) e por carboidratos (N-acetil-Dglicosamina); manteve sua atividade hemaglutinante mesmo a 100° C; não apresentou variação de atividade em presença de íons (Ca^{2+} e Mg^{2+}); nem em diferentes valores de pH (2,0 – 10,0). Os resultados in vivo revelaram que tanto o EB quanto CfeLL (50 mg/kg) reduziram em 43,45% e 41,12% o tamanho do tumor sólido sarcoma-180. As preparações também diminuíram em até 63% as contorções e estiramentos dos ratos tratados com EB (30mg/kg) e em até 53% dos ratos tratados com CfeLL (30 mg/kg). Na avaliação da atividade antiinflamatória apresenta inibição da inflamação em 48% dos animais quando tratados com EB (100mg/kg) e 46% quando tratados com CfeLL(100mg/kg). Os resultados portanto revelam que tanto o EB quanto a Lectina possuem afinidade por fetuina, soro fetal bovino e N-acetil-D-glicosamina. São termoestáveis e não se alteram em presença de íons e em diferentes valores de pH. Os testes com camundongos mostraram que EB e CfeLL possuem atividade antitumoral, analgésica e antiinflamatória, podendo ser comparados aos resultados de fármacos já utilizados. Dessa forma confirma-se a crença popular da utilização para tratamento de úlceras gástricas e como cicatrizante.

Palavras-chave: Lectinas, *Caesalpinia ferrea*, Avaliações Biológicas

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins that bind reversibly and specifically to carbohydrates. Because of this feature in the main they were an important tool have biotechnology and is used in various branches of research. *Caesalpinia ferrea* leaves lectins (CfeLL) were purified and with his crude extract (CE) were characterized and evaluated for their potential analgesic, anti-inflammatory and antitumor using female mice. The study started from the interest in exploring the *C. ferrea*, a plant with many therapeutic properties used by folk medicine. Initially it was obtained the crude extract to a 10% solution in 10 mM phosphate citrate buffer pH 6.5. With a sample of the extract was made column chromatography on chitin. CfeLL agglutinated erythrocytes of rabbits and humans and their activity was inhibited by glycoproteins (fetuin and fetal bovine serum) and carbohydrate (N-acetyl-D glucosamine); retained their hemagglutinating activity even at 100 ° C; did not change activity in the presence of ions (Ca²⁺ and Mg²⁺); or at different pH values (2.0 - 10.0). The results in vivo showed that both the EB and CfeLL (50 mg / kg) reduced by 43.45% and 41.12% the size of solid tumor sarcoma-180. The preparations also decreased by 63% in the twisting and stretching of rats treated with EB (30mg/kg) and up to 53% of mice treated with CfeLL (30 mg/kg). in evaluation of the anti-inflammatory activity showed inhibition of inflammation by 48% of the treated animals with EB (100mg/kg) and 46% when treated with CfeLL (100mg/kg). The results therefore show that both the EB and have a Lectin affinity for fetuin, fetal calf serum and N-acetyl-D-glucosamine. Are heat-stable and not change in the presence of ions and different pH values. Tests on mice showed that EB and CfeLL have antitumor activity, analgesic and anti-inflammatory, can be compared to the results of drugs already in use. Thus it is confirmed the popular belief of the use for treatment of gastric ulcers and as a healing.

Key-words: Lectins, *Caesalpineae ferrea*, Biological evaluations

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Atividade Hemaglutinante
AINEs	Drogas antiinflamatórias não-esteroidais
CEEA – UFPE	Comissão de Ética e Experimentação Animal da UFPE
CfeLL	Lectinas de folha de <i>Caesalpinia ferrea</i>
ConA	Cancanavalina A
COX	Ciclooxigenase
Cramoll	Lecinta da <i>Cratilia mollis</i>
DNA	Acido desoxirribonucléico
EB	Extrato bruto
EDTA	Acido etilenodiaminotetracético
FPLC	Cromatografia líquida de rápida resolução
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução (alta pressão)
HPLC-RP	Cromatografia líquida de alta resolução com fase reversa
IFN	Interferon
ILs	Interleucinas
MCP-1	proteína quimioatraente de monócitos-1
MTX	Metotrexato
NAPs	Neurônios aferentes primarios
NCI	Instituto nacional de câncer (do inglês National Cancer Institute)
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase (do inglês nitric oxide sintase)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PGs	Prostaglandinas
pH	Potencial de Hidrogenio
RANTES	quimiocina reguladora da ativação na expressão e secreção de células T normais
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio
S.E.M	Standard error medium

SNC	Sistema nervoso central
TCF	Tampão citrato fosfato
TNF- α	Fator de necrose tumoral (do inglês tumor necrosis factor)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Atuação do NO liberando grande quantidade de radicais livres (-OH). Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000600020 – ACESSO18/11/2009.....	20
Figura 2 - Mecanismo de ação dos medicamentos esteróides. O hormônio esteróide entra na célula (1) se ligando ao seu receptor citoplasmático (2), o complexo hormônio-receptor vai até a núcleo (4) levando informações para o DNA que vai transcrever a informação para um RNAm (5), a fita de RNAm vai para o citoplasma traduzindo a informação genética em uma nova proteína (6) que vai sair da célula para desempenhar sua função no organismo. (http://www.cbiot.ufrgs.br/bioinfo/Aula_07-analgesicos.pdf - acesso 16/11/2009).....	21
Figura 3 - Fórmula estrutural da aspirina.....	22
Figura 4 - Organização do sistema nervoso, mostrando os nociceptores nas extremidades dos neurônios. Fonte: http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dor/o_que_eh_dor.htm - ACESSO 18/11/2009.....	24
Figura 5: estrutura do dipirona e do paracetamol.....	25

FIGURAS DO ARTIGO

FIGURA 1: Frações do EB coletadas da coluna de quitina. O primeiro pico mostra o material não adsorvido pela quitina, o segundo pico mostra o material que foi eluído pelo ácido acético 1M.....	55
--	----

Figura 2:

a) Variação da AH de CfeLL em função da temperatura.....	57
b) Variação da AH de CfeLL na presença dos íons Mg^{2+} e Ca^{2+}	57
c) Especificidade de CfeLL para eritrócitos humanos e de coelho.....	57
d) AH de CfeLL em diferentes valores de pH. CfeLL perde praticamente toda a atividade em pH 9,0, sendo basicamente estável nos demais.....	57

Figura 3:

a) Atividade antitumoral do EB.....	58
b) Atividade antitumoral de CfeLL.....	58

Figura 4:

a) Atividade Antiinflamatória de EB.....	59
b) Atividade Antiinflamatória de CfeLL.....	59

Figura 5:

a) Efeito analgésico de EB.....	60
b) Efeito analgésico de CfeLL.....	60

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1: Rendimentos obtidos na purificação de CfeLL.....	55
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 LECTINAS.....	12
1.1.1 Características peculiares.....	12
1.1.2 Purificação e caracterização.....	14
1.2 LECTINAS DE LEGUMINOSAS.....	15
1.2.1 <i>Caesalpineia ferrea</i>	16
1.3 MECANISMO DE INFLAMAÇÃO.....	17
1.3.1 Mecanismos de ação das células e moléculas inflamatórias....	18
1.3.1.1 Leucócitos.....	18
1.3.1.2 Monócitos e macrófagos.....	18
1.3.1.3 Citocinas e quimiocinas.....	18
1.3.1.4 Oxido nítrico.....	19
1.3.2 Agentes antiinflamatórios.....	19
1.3.2.1 Agentes antiinflamatórios esteróides.....	20
1.3.2.2 Agentes antiinflamatórios não-esteróides (AINEs).....	21
1.4 DOR.....	22
1.4.1 Agentes analgésicos.....	23
1.5 CÂNCER.....	24
1.5.1 Desenvolvimento do câncer.....	26
1.5.2 Agentes antineoplásicos.....	27
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	29
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
4. ARTIGO A SER SUBMETIDOS A REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA.....	44
5. CONCLUSÕES.....	64
6. ANEXOS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 LECTINAS

1.1.1 Características e particularidades

As lectinas se apresentam como um grupo de moléculas representantes da classe das proteínas, que são macromoléculas biológicas com funções variadas no organismo, como por exemplo, hormonal, enzimática, defesa, nutricional, receptor de sinais celulares, transporte e estrutural. Um organismo vivo possui cerca de 15 % do seu peso constituído de proteínas, sendo a molécula orgânica mais abundante nos sistemas vivos.

As lectinas tiveram seu primeiro estudo comprovado após a verificação de que extratos de sementes de mamona, *Ricinus communis*, aglutinavam eritrócitos de animais, cujo estudo foi desenvolvido por Stillmark, em 1888 e representou o marco inicial para os estudos das lectinas, as quais foram definidas como substâncias com capacidade de aglutinar eritrócitos (SHARON E LIS, 1988). As lectinas são também denominadas de aglutininas, hemaglutininas ou fitohemaglutininas (GOLDSTEIN & HAYES, 1978), e podem ser definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune (SHARON & LIS, 1989), que se ligam a carboidratos específicos ou glicocomplexos (DEBRAY et al., 1981; WILSON & PEARSON, 1984).

O termo lectina foi introduzido por Boyd e Shapleig em 1954, sendo originado do latim (*lectus*) o qual significa selecionado, escolhido; esse termo traduz a capacidade das lectinas em reconhecer carboidratos especificamente se ligando de forma não covalente, como também reconhecendo e aglutinando eritrócitos de grupamentos sanguíneos específicos (PEUMANS E VAN DAMME, 1995). Entretanto, com os avanços dos estudos e principalmente da análise estrutural e molecular o termo precisou ser redefinido. Hoje, entende-se por lectina todas as proteínas que possuem no mínimo um domínio não catalítico que se liga de modo reversível a um mono ou oligossacarídeo específico. Essa nova definição se fez necessária para abranger as proteínas que possuíam um comportamento diferenciado em suas propriedades de aglutinar e precipitar glicoconjugados (PEUMANS E VAN DAMME, 1995; 1998).

Entre os seres vivos, as lectinas estão amplamente distribuídas, encontradas em todos os grupos de organismos da natureza, desde os microorganismos até o homem. Em microorganismos a maior variedade de estudos tem sido feito com fungos, tendo sido isolado e purificado diversas proteínas de diferentes espécies (KAWAGISHI et al., 1990; WANG et al., 2003; NGAI E NG, 2004; GOLDSTEIN et al., 2007; LIU et al., 2008). Além de fungos as bactérias e cianobactérias também são alvos de estudos (SYED et al., 1999; YAMAGUSHI et al., 1999).

Outros exemplos são os animais, tanto invertebrados quanto vertebrados. Já foram encontrados lectinas em protozoários (BABAL E RUSSEL, 1999), esponjas (MOURA et al., 2006), anêmona (FENTON-NAVARRO et al., 2003), moluscos (BANERJEE et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2008), crustáceos (ALPUCHE et al., 2005; YANG et al., 2007; SUN et al., 2008), insetos (CHEN et al., 1999; OURTH et al., 2005), Peixes (MURAYAMA et al., 1997; BASIL E ENTLICHER, 1999), anfíbios (LEVERIVRAY et al., 1985), bovinos (YE E NG, 2000), e outros organismos.

No homem, já foi identificada a presença de lectinas em diversos tecidos diferentes, como, por exemplo, no pulmão (DUMPHY et al., 2002; SORENSEN et al., 2007), em placenta (SOLLEUX E COLLEMAM, 2003), nos dendritos (KANAZAWA et al., 2004; KANAZAWA et al., 2007) entre outros.

Nos estudos atuais a maior parte das lectinas já descritas é constituinte de plantas, uma vez que são importantes fontes dessas moléculas. Já foram descritas lectinas de raízes, rizomas, tubérculos, bulbos, folhas, flores, frutos, sementes, vagens, entrecascas e cerne (MO et al., 1993; CORREIA e COELHO, 1995; COELHO e SILVA, 2000; NAEEM et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2003; WANG e NG, 2003; OLIVEIRA et al., 2008a; SÁ et al., 2008; COSTA et al., 2009; SANTOS et al., 2009; VAZ et al 2009).

Como todas as proteínas, as lectinas são formadas por cadeias de aminoácidos, que nesse caso se apresentam em sua grande maioria como aminoácidos carregados eletricamente, dessa forma as lectinas são ricas em aminoácidos ácidos e hidroxilados (KENNEDY et al., 1995). Para identificar a presença de lectinas em uma solução, partindo do pressuposto que reconhecem e aglutinam carboidratos, pode ser feito um ensaio de atividade hemaglutinante (AH) onde os eritrócitos serão reconhecidos pelos sítios de ligação a carboidratos formando ligações reversíveis entre células opostas (SANTOS et al., 2005). A especificidade da ligação carboidrato-lectina pode ser aferida utilizando o método

convencional de hemaglutinação associado com carboidratos atuando como inibidores (CORREIA E COELHO, 1995; WANG E NG, 2006).

Uma das importantes funções dos íons metálicos no nosso organismo é o de se fixar nos sítios ativos de muitas proteínas, ativando ou aumentando o potencial da mesma. Algumas lectinas precisam de íons metálicos bivalentes em sítios específicos, que estimulam o reconhecimento do carboidrato pelo qual tem afinidade ao estabilizar a ligação por fixar as posições dos aminoácidos que interagem com o carboidrato (VAZ et al., 2010)

1.1.2 Purificação e caracterização

As técnicas utilizadas para purificação das lectinas são as mesmas, comuns a purificação de proteínas, na seguinte sequência:

a) Extração: contendo o material de estudo macerado ou triturado em solução salina ou tampão (KAWAGISHI ET AL., 2001); após um período de tempo e temperatura determinados, as proteínas serão solubilizadas na solução, que será filtrada e centrifugada para obtenção do extrato bruto;

b) Fracionamento salino: trata-se de uma purificação parcial obtida por fracionamento salino, em diferentes concentrações, o sal fará as proteínas presentes na solução precipitarem (COELHO E DA SILVA, 2000);

c) Cromatografia: trata-se de todo processo que visa um maior grau de purificação da molécula (BAYNES E DOMINICZAK, 2000). A maioria das lectinas é purificada através de cromatografia por afinidade, devido ao fato de serem ligantes específicas de carboidratos, assim, o carboidrato para o qual a lectina é específica é utilizada como ligante, selecionando apenas a lectina que se pretende estudar (KENNEDY et al., 1995; GERLACH et al., 2002). Outras formas de cromatografias utilizadas são as de troca iônica que liga proteínas com sinais contrários ao da matriz (DATA et al., 2001) e a de exclusão molecular que se baseia na separação das proteínas de acordo com o tamanho da molécula em ordem decrescente (HEU et al., 1995).

Após a purificação da proteína se fazem necessários estudos de caracterização dessa molécula que vão deduzir as características da lectina. Alguns estudos de caracterização são a atividade hemaglutinante, que revela a capacidade da proteína de aglutinar eritrócitos; a dependência da molécula a íons (SHARON E LIS, 1990); a estabilidade da molécula em diferentes temperaturas (OLIVEIRA et al., 2002) e diferentes valores de pH (KONOZY et al.,

2003); a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (REYNOSO-CAMACHO et al., 2003); HPLC (cromatografia líquida de alta pressão), HPLC-RP (cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa) e FPLC (cromatografia líquida de rápida resolução) (WONG E NG., 2003).

1.2 LECTINAS DE LEGUMINOSAS

Esse grupo de lectinas corresponde a um grupo particular que, como o próprio nome sugere, é encontrado apenas na família das leguminosas. As leguminosas constituem uma família de plantas angiospermas, também chamadas de Fabacea, essa família se subdivide em três subfamílias, a Papilionoideae, a Mimosoideae e a Caesalpinoideae. As leguminosas constituem uma das quatro principais famílias de angiospermas da região nordeste do Brasil, sua distribuição é bastante intensa em todo o território brasileiro, com destaque para a região Nordeste. A principal característica visual dessa família são os frutos na forma de vagem, os exemplos econômicos mais importantes são o feijão, o amendoim, o grão de bico, a fava, a lentilha e a soja, o que revela uma grande importância nutricional e econômica dessa família. O valor histórico também está a ela associado uma vez que a árvore que deu origem ao nome do Brasil também é um representante desta subfamília, a *Caesalpinia equinata*, popularmente chamada de Pau-Brasil, muito distribuída em nosso território, já tendo sido um importante utensílio para corante em indústrias têxteis da idade média. Hoje, porém, com o avanço da tecnologia e o aparecimento de corantes mais eficientes o pau-brasil tem sido muito utilizado em praças juntamente com o pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*).

Alguns exemplos de lectinas conhecidas e bem estudadas do grupo das leguminosas são a concanavalina A (Con A) obtida da semente de *Canavalia ensiformis*, feijão de porco (OLIVEIRA, 2009) e a Cramoll obtida da semente de *Cratylia mollis*, feijão camaratu (Paiva e Coelho, 1992; Correa e Coelho, 1995).

As lectinas desse grupo têm em comum a estrutura molecular, que se apresenta de forma homóloga, entretanto, variam de acordo com a especificidade para os carboidratos. Devido ao fato de terem estrutura parecida, porém serem bastante variadas quanto à especificidade esse grupo de lectinas tornou-se um grupo bastante importante em estudos científicos atuando como importante ferramenta biotecnológica. A importância das lectinas nessas plantas também deve ser destacada; algumas estão envolvidas na simbiose entre

legumes e a fixação de nitrogênio da bactéria do gênero *Rhizobium* (VAN DAMME et al., 1998)

1.2.1 *Caesalpineia ferrea*

Dentre toda a variedade de plantas pertencentes a família das leguminosas, uma espécie em particular chama a atenção. Trata-se da *Caesalpineia ferrea*, popularmente chamada de pau-ferro ou jucá, esta planta pertence à subdivisão Caesalpinoideae e é bastante distribuída em todo o território brasileiro (BRAGANÇA, 1996; LORENZI, 2002). Devido ao clima e as condições de solo é encontrada com mais frequência nas regiões Norte e Nordeste do país, com destaque para os estados de Pernambuco e Ceará (ALZUGARAY, 1984).

Possui inflorescências amarelas com flores bem pequenas; frutos marrom-escuro, do tipo legume (vagem), contendo sementes pequenas, firmes e bem escuras; as folhas são compostas, o que também é uma característica da família; é uma árvore de porte médio com cerca de 10 a 15 metros de altura, seu tronco é curto, entretanto muito utilizado para construção civil e lenha. Devido a sua beleza é comum encontrar o pau-ferro ornamentando avenidas e praças, além disso é uma forrageira muito importante no Nordeste, devido a sua adaptação natural à região e a capacidade de fornecer forragem mesmo durante a seca (NASCIMENTO et al., 2002).

O pau-ferro é uma planta de destaque na medicina popular, sendo usada como terapêutica de diversos problemas de saúde, movidos pela sabedoria popular estudos científicos já comprovam várias utilidades terapêuticas do pau-ferro, como por exemplo: tratamento de ferimentos e contusões, alívio de tosses e asma (BRAGA, 1976; HASHIMOTO, 1996); ação antifúngica (LIMA et al., 1994); antiulcerogênica (BACCHI E SERTIE, 1994; BACCHI et al., 1995); antiinflamatória (SILVA et al., 2008); analgésica (CARVALHO et al., 1996; THOMAS et al., 1988); tratamento de diabetes (BALBACH, 1972); prevenção do câncer (NAKAMURA et al., 2002a); antitumoral (NAKAMURA et al., 2002b); cicatrizante (PENNA, 1964; PIO CORRÊA, 1984; LEWIS, 1987); descongestionante (BALBACH, 1972); antireumático (BRAGANÇA, 1996; GOMES, 2003). De acordo com o teste fitoquímico feito com o extrato hidroalcoólico da casca e da folha, foram identificados a presença de flavonóides, taninos, saponinas, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos (GONZALEZ ET AL., 2004).

Devido a toda essa importância terapêutica e a grande utilização na cultura popular, as lectinas despertam cada vez mais interesse em estudos biotecnológicos sobre essa planta.

1.3 MECANISMO DE INFLAMAÇÃO

Os estudos sobre a ação inflamatória do organismo tem interesse médico desde muitos anos antes de cristo. As características clínicas já eram muito bem definidas há 3000 a.C., os estudos avançados mostram a importância de se conhecer esse mecanismo de defesa do organismo que se não tratado adequadamente pode levar a morte. Em conceito, os objetivos da inflamação são o de localizar a região agredida, eliminar o agente agressor e remover os tecidos degenerados, preparando a área lesada para reparação (JUNIOR e DANTAS, 2000). Dessa forma o mecanismo é bem mais complexo do que aparenta, envolvendo uma complexa variedade de células (neutrófilos, macrófagos e células mononucleares), bem como moléculas inflamatórias como prostaglandinas (PGs), óxido nítrico (NO), citocinas pro-inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 12 (IL-12), interferon γ (IFN- γ) e quimiocinas. A primeira detecção da inflamação é evidenciada pela presença dos neutrófilos que são as primeiras células a migrarem para o local inflamado (MIYAZAKI et al., 2000; KEY et al., 1982; ADAMS e HAMILTON., 1984).

Clinicamente a inflamação pode ser definida como um processo patofisiológico inicial dos tecidos vivos diante de uma variedade de estímulos lesivos que levam ao acúmulo de fluido plasmático e células sanguíneas no local; é caracterizada por vermelhidão e aumento de temperatura local, causada pela dilatação dos vasos e aumento do fluxo sanguíneo no local inflamado, bem como edema provocado por acúmulo de líquido nos espaços intersticiais. Além da dor resultante de uma combinação de fatores, inclusive a pressão nos terminais nervosos resultante dos edemas e perda de função, que pode ser total ou parcial, que se refere a uma resposta da injúria provocada pelo dano (SOSA et al., 2002; STEVENS; LOWE, 2002; WANNMACHER; FERREIRA, 2004; HANSEL; DINTZIS, 2007).

1.3.1 Mecanismo de ação das células e moléculas inflamatórias

1.3.1.1 Leucócitos

O processo inflamatório fica evidenciado a partir do acúmulo de leucócitos, principalmente os neutrófilos e células derivadas dos monócitos, isso representa a característica mais importante da reação inflamatória.

De acordo com RANG (2003) os eventos causados pelos leucócitos são marginação e rolamento, adesão, transmigração (diapedese ou quimiotaxia), fagocitose e degradação celular. De uma forma geral, os leucócitos incorporam e degradam as bactérias e demais componentes estranhos, destruindo através de produtos tóxicos do oxigênio e posteriormente digerindo enzimaticamente.

1.3.1.2 Monócitos e macrófagos

Os monócitos chegam à área inflamada, algumas horas depois dos leucócitos, sendo transformados em macrófagos nos tecidos, sua ação é bem parecida ao dos leucócitos, porém com algumas quimiocinas adicionais – proteína quimioatraente de monócitos-1, MCP-1 e quimiocina reguladora da ativação na expressão e secreção de células T normais, RANTES (KUMAR et al., 2005a). A presença de macrófagos em associação com outros fatores atraem outros leucócitos para a área, reação que provoca o fenômeno da febre, secretam NO, radicais livres e etc (RANG et al., GORDON, S., 2001; HERMANN et al., 2001).

1.3.1.3 Citocinas e quimiocinas

Citocinas são pequenas proteínas, que atuam se ligando a receptores específicos de membrana, desencadeando uma cascata que leva a indução, favorecimento ou inibição de vários genes no núcleo celular (RANG et al., 2003). Elas são geralmente sintetizadas por linfócitos e macrófagos estimulados por invasores do organismo ou mediadores inflamatórios. Exemplos comuns de citocinas são linfocinas, monocinas, interleucinas, fatores de crescimento, etc.

As propriedades gerais das citocinas são meia-vida curta, modulam a resposta imune, produção e modulação de vários tipos de células, interação com outras citocinas e reconhecimento através de receptores específicos (ZHANG 2008).

Citocinas de baixo peso molecular e de função quimiotática são chamadas de quimiocinas, elas criam um gradiente químico controlando a locomoção dos leucócitos, portanto na verdade são coordenadores da movimentação dos componentes envolvidos nas reações inflamatórias e imunológicas. Outras funções das quimiocinas são as de promover angiogênese e causar desgranulação dos mastócitos.

1.3.1.4 Oxido nítrico

É uma molécula lipossolúvel com poucos segundos de meia-vida produzida a partir do aminoácido arginina pela ação da oxido nítrico sintase (NOS) (GOMES e BEL, 2003; ZHANG, DAWSON e DAWSON, 2006).

Por ser uma molécula bastante reativa, o aumento das concentrações de NO podem causar lesões celulares por produzirem radicais livres que favorecem os danos do estresse oxidativo (figura 1) (WEI et al., 2003). Outro fator afetado pelo excesso de NO é a liberação excessiva de glutamato com conseqüente entrada de cálcio no terminal pós-sináptico e ativação da NOS cálcio-dependente, o que vai ser um alimentador do processo funcionando como um ciclo, já que a NOS é a enzima que catalisa a reação de produção de NO, esse processo recebe o nome de excitotoxicidade glutamatérgica (DUNCAN e HEALES, 2005).

Através de mecanismos ainda desconhecidos completamente o NO contribui para doenças neurodegenerativas. Algumas evidências mostram o potencial de NO em causar danos no DNA, modificações em proteínas e associação no processo de excitotoxicidade, esses fatores ocasionam grande parte dos danos cerebrais que ocorrem em doenças neurodegenerativas, mostrando assim a relação do NO a essas doenças.

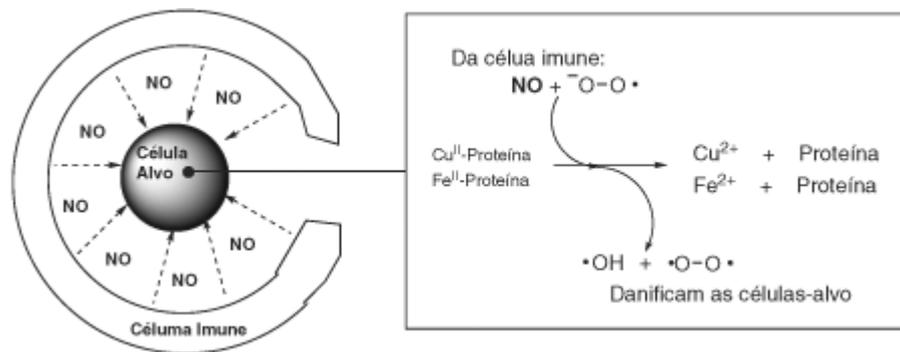
1.3.2 Agentes antiinflamatórios

A descoberta do mecanismo inflamatório foi um grande passo para o desenvolvimento de fármacos capazes de interromper a sinalização inflamatória. Embora cada fármaco antiinflamatório possua um mecanismo de ação próprio o principal objetivo geral é o de impedir o agravamento da inflamação, não permitindo que ele se torne lesivo em extremo,

evitando assim a potencialização da agressividade flogógena inicial (LEMANSKE e BUSSE, 2006).

Os agentes antiinflamatórios são divididos em dois grupos distintos, de acordo com seu mecanismo de ação, os antiinflamatórios esteróides e os não-esteróides (AINEs) (LEE; KATAYAMA, 1992; WANNMACHER; FERREIRA, 2004a)

Figura 1: Atuação do NO liberando grande quantidade de radicais livres (-OH).



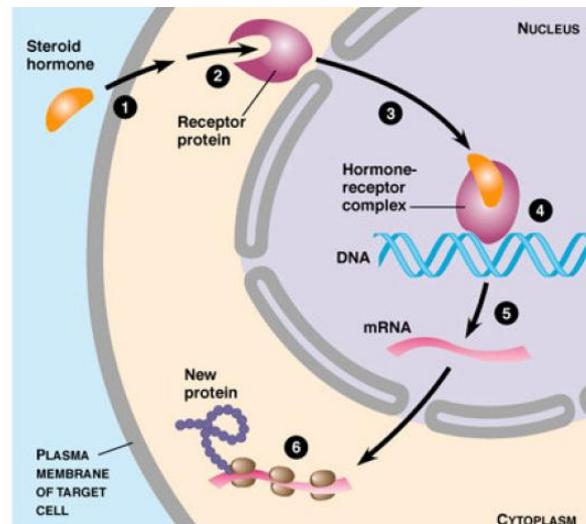
Fonte: disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000600020> acesso em 18 de Nov 2009

1.3.2.1 Agentes antiinflamatórios esteróides

Os glicocorticóides constituem um grupo importante das moléculas corticosteróides com função antiinflamatória (**figura 2**). Como todos os corticosteróides eles são fabricados pela glândula adrenal e, são moléculas análogas a hidrocortisona (DELVIN, 1998). Sua ação se dá pela inibição de fosfolipases, não permitindo a liberação do ácido araquidônico das membranas das células lesadas. Como conseqüências diminuem a transcrição de genes que expressam citocinas, alteram o grau de fibrose e inibem as funções específicas dos linfócitos (CHROUSOS, 1995; BORNE, 2002; COCICOV et al., 2004; WANNMACHER; FERREIRA, 2004b; HOWLAND; MYCER, 2006).

Esses agentes permitem tratamento para diversas doenças inflamatórias como lúpus, asma, artrite, esclerose múltipla, etc. (GAYATHRI et al., 2007).

Figura 2: Mecanismo de ação dos medicamentos esteróides.



O hormônio esteróide entra na célula (1) se ligando ao seu receptor citoplasmático (2), o complexo hormônio-receptor vai até a núcleo (4) levando informações para o DNA que vai transcrever a informação para um RNAm (5), a fita de RNAm vai para o citoplasma traduzindo a informação genética em uma nova proteína (6) que vai sair da célula para desempenhar sua função no organismo.

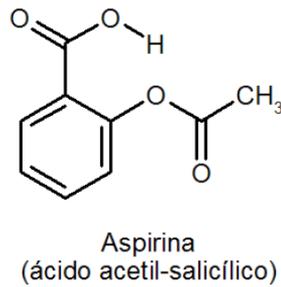
Fonte: disponível em <http://www.cbiot.ufrgs.br/bioinfo/Aula_07-analgescicos.pdf> acesso em 16 de nov 2009.

1.3.2.2 Agentes antiinflamatórios não-esteróides (AINEs)

Os AINEs possuem estrutura bem variada e apresentam como principais propriedades os efeitos antiinflamatório, analgésico e antipirético, podendo ainda apresentar efeitos antitrombótico e uricosúrico (COSSERMELLI; PASTOR, 1995). Eles atuam inibindo a enzima ciclooxigenase que é chave para a síntese de prostaglandinas. A ciclooxigenase (COX) pode ser encontrada sob três isoformas, a COX-1 (constitutiva) e COX-2 (induzida), e recentemente foi relatada a existência da COX-3 (CHANDRASEKHANRAN et al., 2002).

Devido à existência de diferentes ciclooxigenases, as prostaglandinas também são diferentes, sendo as prostaglandinas oriundas de COX-2 as responsáveis pela mediação da dor, febre e inflamação.

Os exemplos mais comuns desses fármacos são aspirina (**figura 3**), indometacina e piroxicam, seletivos para a COX-1, diclofenaco de sódio e meloxicam, seletivos para COX-2. (LAGES et al., 1998; WALLACE e CHIN, 1999; SIMMONS, 2006).

Figura 3: Fórmula estrutural da aspirina

1.4 DOR

Atualmente o conceito de dor mundialmente usado é o estabelecido pela associação internacional de estudos da dor (IASP), que afirma que a dor é “uma experiência sensorial e emocional desagradável que primariamente associamos a lesão tecidual ou a descrevemos em termos desta lesão ou ambos” (IASP, 2004). Geralmente a dor é associada à inflamação como um processo secundário originado pela liberação de mediadores álgicos (HUNSKAAR e HOLE, 1987; OSABEDE e OKOY’E, 2003).

A dor pode ser decorrente de diferentes estímulos e condições, que vão depender do tecido lesado, da natureza, da intensidade e da duração do estímulo. Geralmente ela se inicia em áreas periféricas como a pele, sendo identificada pela ativação de neurônios nociceptores que reagem a estímulos danosos como temperatura, pressão mecânica e mediadores inflamatórios (HANSSON, 2005). Em resposta ao estímulo identificado iniciam-se as vias nociceptivas que incluem a excitação das fibras nervosas, mudanças de fenótipo celular e estrutura neural, sinapses e expressões de novas moléculas, incluindo enzimas, neurotransmissores e receptores. As fibras nervosas estendem-se até o interior da medula espinhal, a outra extremidade capta sensações. Quando o estímulo nocivo é detectado periféricamente é disparado um impulso elétrico que é propagado por toda a fibra nervosa, passando por nociceptores e atingindo a medula espinhal (BASBAUM e JULIUS, 2006).

De acordo com Prado (2001) devemos reconhecer dois tipos de dor, a dor aguda e a crônica. A dor aguda é bem mais simples embora que tenha um papel fundamental, sendo apresentada quando ocorre um estímulo nocivo intenso, bem localizado e tendo curta duração caso não haja lesão de tecido. Geralmente é causada por processos identificáveis, sejam inflamatórios, espásticos ou isquêmicos. Os NAPs (neurônios aferentes primários) garantem o funcionamento sendo capazes de codificar o estímulo nocivo quanto a modalidade,

intensidade, duração e localização (BROWN; BOTTOMLEY, 1990; TURK; MELZACK, 1992; PRADO, 2001).

Enquanto que a dor aguda é necessária ao ser vivo, uma vez que indica problemas que ameaçam sua sobrevivência, a dor crônica é um mecanismo aberrante prejudicial e comprometedor do sistema vivo. Modificações ocorridas na matriz do sistema nervoso, em função da persistência de informações aberrantes que aí aportam, levam às expressões de genes que conferem um perfil funcional anormal, cuja expressão é a dor. As dores crônicas podem ser entendidas como as que se mantêm após a cura da lesão inicial, ou que persistem além de semanas ou meses. Assim, mais do que um sintoma (dores agudas) são consideradas hoje mundialmente como uma doença (FEUERSTEIN; HICKEY, 1992; PLEUVRY; LAURETTI, 1996; MACFARLANE et al., 1997; WOOLF; MARNION, 1999; FERREIRA, 2001; PERISSINOTTI, 2001; PRADO, 2001; TURK; OKIFUJI, 2001; MCQUAY, 2002; FERREIRA, TORRES, 2004).

O fenômeno em que o corpo percebe e responde ao estímulo doloroso é chamado de nocicepção e pode variar de acordo com a dimensão do estímulo. Os nociceptores são os responsáveis por receber o estímulo, eles estão localizados nas terminações livres dos axônios periféricos dos NAPs (**figura 4**), estão localizados em todo o corpo, exceto no cérebro e nos ossos. Em seguida ocorre a hiperalgesia, onde a sensibilidade dos nociceptores aumenta. O estímulo é levado até o SNC onde os gânglios da raiz dorsal sintetizam diversas substâncias que irão atuar como neurotransmissores e neuromoduladores da dor. Em seguida os corpos celulares dos NAPs, que estão localizados nos gânglios da raiz dorsal, enviarão essas substâncias tanto para o ramo periférico quanto para o ramo central das NAPs, exercendo função na dor tanto periférica quanto centralmente (PRADO, 2001; TEIXEIRA, 2001,b).

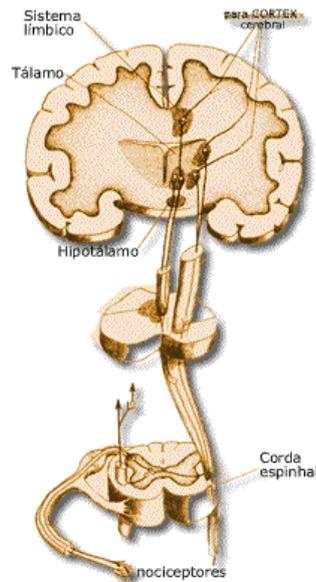
1.4.1 Agentes analgésicos

A analgesia pode ser classificada como o estado em que o indivíduo não sente mais dor, através da interrupção dos impulsos nociceptivos (BATISTETTI, 2001). Didaticamente eles podem se dividir em analgésicos opióides e não opióides.

Os opióides são muito utilizados tanto no tratamento da dor aguda quanto da crônica (FERREIRA; HIDALGO; CAUMO, 2004; HANSON, 2004). Eles atuam com o efeito analgésico deprimindo os mecanismos centrais envolvidos na nocicepção e interferindo

na interpretação da dor, atuando também no sistema límbico (HOUDE, 1979; FERRER-BRECHNER; GANZ, 1984; FOLEY; MACALUSO, 1992).

Figura 4: Organização do sistema nervoso, mostrando os nociceptores nas extremidades dos neurônios.



Fonte: disponível em <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dor/o_que_eh_dor.htm> acesso em 18 de nov 2009

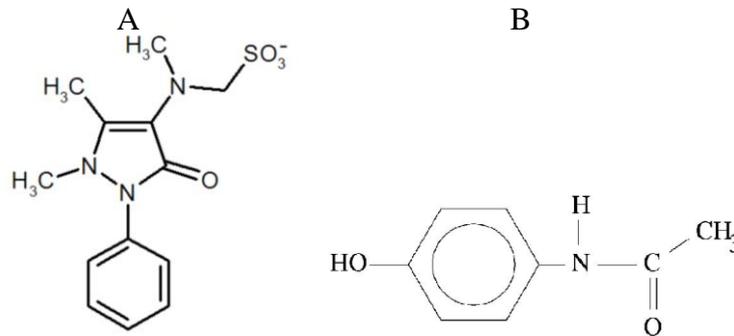
Os não opióides além das propriedades analgésicas, também têm propriedades antitérmicas e antiinflamatórias, pois estão associados a inibição das COX e são conhecidos por não serem viciantes. Eles são indicados para dores leves e moderadas, os mais tradicionais são dipirona e acetaminofeno (paracetamol) (**figura 5**), embora seus mecanismos ainda sejam controversos (ROBERTS II; MORROW, 2001; BASSANEZI; OLIVEIRA FILHO, 2006) existindo estudos que sugerem esses fármacos como inibidores de COX-2 (BRODY, 1997; CAMPOS et al., 1999; ROBERTS II; MORROW, 2001).

1.5 CÂNCER

Como indicadora de problemas no organismo a dor também pode ser um indicador de graves doenças e tende a ser um dos maiores sintomas em pacientes com câncer durante todas as fases de evolução da doença e o mais temido, podendo preceder o

diagnóstico, estender-se durante a fase de tratamento ativo, assim como nas fases avançadas e terminal da doença (REDDY, 2000).

Figura 5: Estrutura do dipirona (A) e do paracetamol (B).



Também comumente chamado de neoplasia ou processo maligno, o câncer ocorre no organismo após um descontrole na divisão celular de uma célula anômala produzindo células filhas também anômalas. Obviamente o tecido que abriga as células em questão vão ter seu funcionamento alterado comprometendo todo o organismo. Atualmente o câncer é a segunda principal causa de mortalidade em países desenvolvidos, enquanto que em países em desenvolvimento seu número vem crescendo (ALBERTS e al., 1999; SCHREIBER, 1999; STEVENS; LOWE, 2002; RANG et al., 2004).

Geralmente o câncer é uma doença gerada a partir de células isoladas. O resultado disso é que os genes não são afetados e a doença não pode ser passada pelas gerações. Entretanto, em casos mais raros o câncer pode afetar as linhagens germinativas dos genes podendo causar suscetibilidade genética nos descendentes (ALBERTS et al., 1999; CALLERY; GANNETT, 2002; KLIG; CUMMINGS, 2002). Dessa forma o cancer pode ser considerado uma doença genética, podendo ser transmitido a células normais por genes que sofreram mutações. Essas mutações podem ser promovidas por agentes químicos e físicos do meio ambiente ou por produtos tóxicos da própria célula, como radicais livres, por exemplo. Essas mutações ocorrem em genes codificadores de proteínas envolvidas no controle da proliferação e diferenciação celular (PARK et al., 2000; HANAHAN et al., 2001; TLSTY et al., 2001).

O câncer está associado a grandes alterações genéticas de modo que a maioria dos tumores humanos está associada a mudanças cromossômicas (KLUG; CUMMINGS, 2002).

Entretanto, a total compreensão do câncer está muito longe de acontecer; a facilidade de desenvolver câncer em alguns organismos provavelmente está associada a uma predisposição a quebras de DNA e a incapacidade de reparar erros (DESCH, 2002).

1.5.1 Desenvolvimento do câncer

De todos os casos, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais. Alguns deles são bem conhecidos: o cigarro pode causar câncer de pulmão, a exposição excessiva ao sol pode causar câncer de pele, e alguns vírus podem causar leucemia. Outros estão em estudo, tais como alguns componentes dos alimentos que ingerimos, e muitos são ainda completamente desconhecidos. O envelhecimento traz mudanças nas células que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna. Isso, somado ao fato de as células das pessoas idosas terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco para câncer, explica em parte o porquê de o câncer ser mais freqüente nesses indivíduos. Os fatores de riscos ambientais de câncer são denominados cancerígenos ou carcinógenos. Esses fatores atuam alterando a estrutura genética (DNA) das células (NUNES et al., 2000; AGNEZLIMA et al., 2001).

A definição do desenvolvimento do câncer pode ser avaliada de acordo com o comportamento celular das células que sofreram as mutações. Essas células agora definidas como células cancerosas passaram a exibir comportamentos diferenciados das células normais (MENDELSON, 1995), o primeiro é a *origem clonal* em que múltiplas alterações celulares marcam os vários passos da progressão maligna. Durante o caminho, mecanismos protetores promovem a eliminação apoptótica de muitas células defeituosas. O acúmulo de um grupo de alterações específico é capaz de provocar o escape às defesas, dando início ao câncer.

A *autonomia* é o segundo passo identificado em células malignas, onde elas podem se dividir descontroladamente; a *anaplasia* é outra reação anômala de células cancerosas, onde as células altamente diferenciadas passam por um processo em que elas vão se tornar células pouco diferenciadas, ou seja, nas células neoplásicas o estado é indiferenciado. Por fim, o processo de agravamento do câncer ocorre na *metástase*, onde as células tumorais se espalham comprometendo outros órgãos do corpo, bem como o aparecimento de células neoplásicas em locais diferentes daqueles em que elas foram originadas, a metástase simboliza uma grave complicação para o paciente devido à distribuição da patologia em todos os sistemas principalmente por invasão local e dimensões

linfática, vascular e transcelômica (MENDELSON, 1995; ALBERTS et al., 1999; CALLERY; GANNETT, 2002; STEVENS; LOWE, 2002; THOMAS, 2003).

As células mutantes, em particular, também apresentam algumas alterações estruturais como, por exemplo, perda de junções celulares e diferenciação do glicocálice, estruturas fundamentais no contato célula-célula, bem como da célula com a matriz celular da célula adjacente, o que provavelmente é o responsável pelo processo metastático dos tumores (BROOKS, 2000; BROOKS; CARTER, 2001; THIES et al., 2001; SILVERTHORN, 2003).

Outro fator agravante na neoplasia é a capacidade que os tumores têm de possuir suprimento sanguíneo próprio chamado de angiogênese, o que facilita seu desenvolvimento, além disso, algumas células malignas tornam-se resistentes a morte celular programada (apoptose) o que as torna resistentes ao tratamento médico, mesmo até os mais agressivos, como a quimioterapia e radiações ionizantes (DESCH, 2002).

1.5.2 Agentes antineoplásicos

Atualmente o tratamento para o câncer tem se estabelecido principalmente de três formas: o tratamento cirúrgico, utilizado com mais frequência em tumores sólidos; a radioterapia usada como adjuvante da cirurgia quando o tumor for sensível a ela; e a quimioterapia, utilizada em tumores generalizados, ou seja, espalhados por todo o corpo (FERNANDES JÚNIOR, 2000; SILVA; ALMEIDA, 2000; SOARES, 2000; CALLERY; GANNETT, 2002; RANG et al., 2004).

A busca por medicamentos antineoplásicos tem sido constante, uma vez que se procuram agentes mais específicos a células tumorais e que não agridam as células normais. O fato é que existe muito pouca diferença entre uma célula normal e uma célula cancerosa o que dificulta o reconhecimento por parte do medicamento, acarretando na destruição de células em geral.

A grande maioria dos agentes atua no DNA, impedindo a duplicação celular, não permitindo que o material genético anormal possa se multiplicar. Didaticamente as fases do ciclo celular são: G₀, fase de repouso; G₁, fase de preparação para a síntese de DNA; S, fase de síntese de DNA e outras moléculas da célula; G₂, fase de descanso após o trabalho intenso; M, fase em que a mitose acontece. Independente de qual fase o antineoplásico atue, seu maior objetivo é induzir a apoptose (BOENTE; SAMPAIO FILHO; DEL GIGLIO, 2002; BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004).

De acordo com suas propriedades os agentes antineoplásicos são divididos em varias categorias:

a) Agentes alquilantes: induzem a apoptose alquilando moléculas orgânicas como DNA, RNA e proteínas (BOENTE; SAMPAIO FILHO; DEL GIGLIO, 2002; CALLERY; GANNETT, 2002; THOMAS, 2003; BARROWS, 2004; BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004). Deve ser acompanhada por reparo celular, pois interferem em células neoplásicas e normais, podendo ocasionar metagênese e carcinogênese (RAJEWSKY et al., 2000).

b) Antimetabólicos: os análogos do ácido fólico, das purinas e das pirimidinas, específicos para fase S, impedindo a síntese de ácidos nucleicos. Uma grande vantagem é a capacidade de serem mais eficientes em células com grande crescimento, uma característica de células tumorais (BOENTE; SAMPAIO FILHO; DEL GIGLIO, 2002; CALLERY; GANNETT, 2002; THOMAS, 2003; BARROWS, 2004; BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004).

c) Compostos de platina: constituídos por metais pesados (cisplatina, carboplatina) não são específicos para nenhuma fase e têm mecanismos semelhantes aos agentes alquilantes (CHU, 1994), entretanto são mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos e embriotóxicos. O metotrexato é um antagonista do ácido fólico, único antimetabólico do folato em uso clínico. Usado para tratar tumores de cabeça, câncer de mama, sarcomas, linfomas e tumores germinativos. Como efeito colateral pode provocar vômito, náusea, ulceração oral e gástrica e depressão da medula óssea, entre outros (BERTINO, 1992; WINKELSTEIN, 1992; BOENTE; SAMPAIO FILHO; DEL GIGLIO, 2002; CALLERY; GANNETT, 2002; THOMAS, 2003; BARROWS, 2004).

d) Hormônios e análogos: alteram as reações celulares por meio de ligação a receptores específicos, exemplos: tamoxifeno, leuprolida e flutamida.

e) Antibióticos: atuam formando ligação estável com DNA, impedindo sua duplicação, e conseqüente produção de RNA e proteínas, exemplos: dactinomicina e mitomicina (LAZO; LARNER, 1997; BARROWS, 2004).

f) Produtos vegetais: O mecanismo exato é desconhecido, porém é potente mitotóxico, promovendo a necrose e remoção gradual do tecido lesionado. São específicos para a fase M, atuando por complexação com a tubulina, interrompendo na montagem dos microtúbulos, conseqüentemente interrompendo a divisão celular na metáfase (LAZO; LARNER, 1997; BOENTE; SAMPAIO FILHO; DEL GIGLIO, 2002; CALLERY; GANNETT, 2002; BARROWS, 2004; BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Purificar, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral, antiinflamatória e analgésica de preparações lectínicas da folha de *Caesalpinia ferrea*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato bruto (EB) e a lectina (CfeLL) cromatografada a partir do EB em coluna de quitina.

- Caracterizar as preparações lectínicas quanto a sua estabilidade em temperaturas elevadas e em diferentes valores de pH; influência de íons sobre sua atividade hemaglutinante (AH); inibição da AH por carboidratos e glicoproteínas; identificação do peso molecular aproximado por PAGE.

- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* de EB e CfeLL utilizando células do tumor sarcoma-180.

- Avaliar a atividade antiinflamatória de EB e CfeLL.

- Avaliar a atividade antinociceptiva de EB e CfeLL.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annu. Rev. Immunol.** 2, 283-318. 1984.

AGNEZLIMA, L. F. ; NAPOLITANO, R. L. ; FUCHS, R. P. P. ; MASCIO, P. ; MUOTRI, A. R. ; MENCK, C. F. M. . DNA repair and sequence context affect 1O2-induced mutagenesis in bacteria. *Nucleic Acid Research*, EUA, 2001.

ALLAHTAVAKOLI, M.; SHABANZADEH, A. P.; SADR, S. S.; PARVIZ, M.; DJAHANGUIRI, B. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, reduces infarction volume and neurological deficits in an embolic model of stroke. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 33 (11), 1052-1058. 2006.

ALPUCHE, J.; PEREYRA, A.; AGUNDIS, C.; PASCUAL, C.; SLOMIANNY, M-C; VAZQUÉZ, L.; ZETENO, E. Purification and characterization of a lectin from shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. **Biochimica et biophysica Acta** (BBA) – general subjects, v. 1724, p. 86-93, 2005.

ALZUGARAY, D. **Plantas que curam**. São Paulo: Hemus Press, 1984.

BABAL, P.; RUSSEL, L. C. Siliac acid-specific lectin-mediated adhesion of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas mobilensis*. **The Journal of Parasitology**, v. 85, p. 33 – 40, 1999.

BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A. Anti-ulcer action of *Stryax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Médica**, 60, p. 118 – 120, 1994.

BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A. Anti-ulcer action and toxicity of *Stryax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Médica**, 60, p. 118 – 120, 1995.

BALBACH, A. **As plantas que curam**. São Paulo: tres, 1972, p. 302 – 303.

BANERJEE, S.; CHAKI, S.; BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B. P. Mucin binding mitogenic from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 421, 125 – 134, 2004.

BASIL, V.; ENTLICHER, G. Complextity of lectins from the hard roe of perch (*Perca fluviatilis* L.). **The international Journal of Biochemistry & cell Biology**, v. 31, p. 431 – 42, 1999.

BAYNES, J. ; DOMINICZAK, M. *Bioquímica Medica*. São Paulo, manole, 2000.

BRAGANÇA, L. A. R. **Plantas medicinais Antidiabéticas**. Niterói: EDUFF press, 1996. P. 172.

BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Toward better pain control. *Sci. am.* 294(6): 60-67. 2006.

BASSANEZI, B.S.B.; OLIVEIRA FILHO, A.G. analgesia pós-operatória. **Revista do colégio brasileiro de cirurgiões**, v. 33, n. 2, p.116-122, 2006.

BATISTETTI, P. G. bloqueios analgésicos: riscos e medidas de segurança. In: ANDRADE FILHO, A. C. C. (editor). **Dor: diagnóstico e tratamento**. 1º Ed. São Paulo. Roca, 2001. P. 183-199.

BORNE, R. F. Nonsteroidal anti-inflammatory agents. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medical chemistry**. 5º ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & wilkins, 2002. P. 751-793.

BRODY, T. controle da dor e da inflamação com medicamentos antiinflamatórios não-esteróides. In: BRODY, T. M.; LANER, J.; MINNEMAN. K. P.; NEU, H. C. **Farmacologia humana:da molecular a clínica**. 2º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. P. 344-354.

BROWN, R. S.; BOTOMLEY, M. K. The utilization an mechanism of action of tricyclic antidepressants in the treatment of chonic facial pain: a review of the literature. **Anesthesia progress**, 37, p. 223-229, 1990.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Antiinflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med.** 70(2):93-103. 2004.

CAMPOS, C.; DE GREGÓRIO, R.; GARCIA-NIETO, R.; GAGO, F.; ORTIA, P. ALEMANY, S. Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. **European journal of pharmacology**, 378 (3), p. 339-347, 1999.

CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; DOS SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J. Preliminar studies of analgesic and antiinflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 53, 175 – 178, 1996.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L.; COX-3, a ciclooxigenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipiretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. acad. Sci. USA** 99, 13926-13931. 2002.

CHEN, H.; MONTAGNANI, M.; FUNAHASHI, T.; SHIMOMURA, I.; QUON, M. J. adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. **J Biol Chem**; 278: 45021-6. 2003.

CHEN, C.; ROWELEY, A. F.; NEWTON, R. P.; RATCLIFEE, N. A. Identification, purification and properties of a β -1, 3-glucan-specific lectin from the serum of the cockroach, *blaberus discoidalis* wich is implicated in immune defence reaction. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, p. 309-19, 1999.

CHROUSOS, G. P. The hypotalamic-pituitary-adrenal axis and immunomediated inflammation. **The new England journal of medicine**, 332, p. 1351-1362, 1995.

COCICOV, A. F.; COCICOV, H. L. F.; SILVA, M. B. G.; SKARE, T. L. Uso de corticosteróides por via peridural nas síndromes dolorosas lombares. **Revista brasileira de anesthesiologia**, 54: 1, p. 129-141, 2004.

COELHO, L. C. B. B.; DA SILVA, M. B. R. simple method to purify miligram quantities of the galactose – specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, 295 – 300, 2000.

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

COSSERMELLI, W.; PASTOR, E. H. Antiinflamatórios não-esteróides e doenças reumatológicas. **Revista do hospital das clinicas da faculdade de medicina de São Paulo**, 50, p. 115-124, 1995.

DATTA, K.; USHA, R.; DUTTA, S. K; SINGH, M. A comparative study of thewinged bean protease inhibitors and their interaction with proteases. **Plant physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 949 – 959, 2001.

DELVIN, T. M. Manual de bioquimica com relações clinicas. São Paulo: **Edgard blucher**, p. 265-269, 1998.

DUNCAN, J. A.; HEALES, S. J. R. Nitric oxide and neurological disorders. **Molecular aspects of medicine**. 26, 67-96. 2005.

DUNPHY, J. L.; BARCHAM, G. J.; BISCHOF, R. J.; YONG, A. R.; NASH, A.; MEEUSEN, E. N. T. Isolation and characterization of a novel eosinophyl-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 14916-24, 2002.

FENTON-NAVARRO, B.; ARREGUIN-L, B.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, E.; HEIMER, E.; AGUILAR, M. B.; RODRIGUEZ-A, C.; ARREGUÍN-ESPINOSA, R. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillensis*. **Toxicon**, v. 43, p. 525 – 532, 2003.

FERREIRA, M. B. C.; HIDALGO, M. P. L.; CAUMO, W. Analgésicos opióides. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. (editores). **Farmacologia clinica: fundamentos da terapeutica racional**. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. P. 229-235.

FERREIRA, M. B. C.; TORRES, I. L. S. dor crônica. In: KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Bases biológicas dos transtornos psiquiatricos**. 2º ed. Porto alegre: ArtMed, 2004. P. 347-365.

FERREIRA, P. E. M. S. Dor crônica: avaliação e tratamento psicologico. In: ANDRADE FILHO, A.C.C. (editor). **Dor: diagnostico e tratamento**. 1. Ed. São Paulo: Roca, 2001. p. 43-52.

FERRER-BRACHNER, T.; GANZ, P. Combination therapy with ibuprofen and methadone for chronic cancer pain. **American journal of medicine**, 77, p. 78-83, 1984.

FEUERSTEIN, M.; HICKEY, P. F. Ergonomic approaches in the clinical assessment of occupational musculo eskeletal disorders. In: TURK, D. C.; MELZACK, R. (editors). **Handbook of pain assessment**. New York: the Guilford Press, 1992, p. 71-99.

FOLEY, K. M.; MACALUSO, C. Adjuvante analgesics in cancer pain management. In: ARONOFF, G. M. (editor). **Evaluation and treatment of chronic pain**. 2. Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1992, p. 340-348.

GAYATHRI, B.; MANJULA, N.; VINAYKUMAR, K. S.; LAKSHMI, B. S.; BALAKRISHNAN, A. A pure compound from *Boswellia serrata* extract exhibits antiinflammatory property in human PBMCs and mouse macrophages through inhibition of TNF- α , IL-1 β , NO and MAP kinases. **Int. immunopharmacol.** 7, 473-482. 2007.

GERLACH, D.; WAGNER, M.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U. Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. **FEM. Microbiology Letters**, 10579, 61-68, 2002.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M. I.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? *Nature* 285:66, 1978.

GOLDSTEIN, I. J.; WINTER, H. C.; AURANDT, J.; CONFER, L.; ADAMSON, J. T.; HAKANSSON, K.; REMMER, H. A new α -galactosyl-binding protein from the mushroom *Lyophyllum decastes*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 467, p. 268-74, 2007.

GOMES, M. Z.; BEL, E. A. Effects of electrolytic and 6 hydroxydopamine lesions of rat nigrostriatal pathway on nitric oxide synthase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase. **Brain reshearsh bulletin**. 62, 107-115. 2003.

GOMES, R. (1997) Oncologia básica. Editora: **Revinter**, RJ.

GONZALEZ, F. G.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividade antioxidante e o perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. In: Semana Farmaceutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 2004, São Paulo. **Revista Brasileira de Ciencias Farmacêuticas**. São Paulo: Faculdade de Ciencias Farmaceuticas da Universidade de São Paulo, v. 40. p. 79, 2004.

GONZALEZ-REY, E.; CHORNY, A.; DELGADO, M. Regulation of immune tolerance by antiinflammatory neuropeptides. **Nature Rev. Immunol.** 7(1):52-63. 2007.

GORDON, S.; macrophage function disorders. **Encyclopedia life S'ciences**; 1:I-II. 2001.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 'The hallmarks of cancer', in Cell, v. 100, p. 57, 2000.

LIOTTA, L. A. & KOHN, E. C. 'The microenvironment of the tumourhost interface', in Nature, v.411, p. 375, 2001.

HANSEL, D. E.; DINTZIS, R. Z. fundamentos de patologia. Rio de Janeiro: guanabara Koogan, 2007. 937 p.

HANSON, G. R. analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios. In: GENNARO, A. R. (editor). **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. Ed rio de Janeiro: guanabara Koogan, 2004. P. 1502-1521.

HANSSON, P. T.; neuropathicpain: definition, epidemiology, classification, and diagnostic work-up. An Updated Review: Refresher course syllabus. IASP Press. **Pain**. Seattle pp 91-95. 2005.

HASHIMOTO, G. (ed). **Illustred Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants**. Aboc-Sha: Kamakura, p. 646, 1996.

HEU, M. S.; KIM, H. R.; PYEUN, J. H.; Comparration of trypsin and chymotrysin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 112 (B), n. 3, p. 557-567, 1995.

HERSCHMAM, H. R.; Prostaglandin synthase 2. **Biochim. Biophys. Acta**. 5:1299(1):125-140. 1996.

HERMANN, G. E.; ROGERS, R. C.; BRESNAHAN, J. C.; BEATTIE, M. S. tumorNecrosis Factor-Alphainduces Cfos and Strongly. Potentiates Glutamate-Mediated CellDeath in the Rat Spinal Cord. **Neurobiology of Diseases**.; 8:590-599. 2001.

HOUDE, R. W. systemic analgesics and related drugs: narcotic analgesics. In: BONICA, J. J.; VENTAFRIDA, V. (editores). **Advances in pain research and therapy**. New York: Raven Press, 1979. v. 2, p. 263-273.

HOWLAND, R. D.; MYCEK, M. J. **Lippincott's illustrated reviews: pharmacology**. 3. Ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 552 p.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. v. 30, 103-104. 1987.

International Association for the Study of Pain. IASP Pain Terminology. Available from <URL: <http://www.iasp-pain.org/terms-p.html#Pain>> [November, 2004, 9]

JUNIOR, J. F. S.; DANTAS, C. J. S. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. Rio de Janeiro: **Editora Médica e Científica**, 1:5-12. 2000.

KAWAMATSU, Y.; SARAIE, T.; IMAMIYA, E.; NISHIKAWA, K.; HAMURO, Y. Studies on antihyperlipidemic agents. I. synthesis and hypolipidemic activities of phenoxyphenyl alkanolic acid derivatives. **Arzneim Forsch / Drug Res**; 30: 454-459. 1980.

KANAZAWA, N. Dendritic cell immunoreceptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. **Journal of Dermatological Science**, v. 45, p. 77-86, 2007.

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

KAWAGISHI, H.; NOMURA, A.; MIZUNO, T.; KIMURA, A.; CHIBAS, S. Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies. N **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1034, p. 247-52, 1990.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydr. Polym.**, v. 26:219 – 30, 1995.

KEY, M. E.; HOYER, L.; BUCANA, C.; HANNA, M. G.; mechanisms of macrophage-mediated tumor cytotoxicity. **Adv. Exp. Med. Biol.** 146, 265-310. 1982.

KONOZY, E. H.; BERNARDES, E. S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. Isolation, purification and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 222-29, 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Patologia – bases patológicas das doenças, editora Saunders Elsevier, 7. Ed. p. 1504, 2005a.

LAGES, A. S.; ROMEIRO, N. C.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Rofecoxib (vioxx) foi também lançado no Brasil como inibidor seletivo de PGHS-2, representando uma segunda geração de agentes AL, **Quim. Nova** 21,761°. 1998.

LEE, J. B.; KATAYAMA, S. inflammation and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: SMITH, C. M.; REYNARD, A. M. **Textbook of pharmacology**. Philadelphia: W. B. saunders company, 1992. P. 401-435.

LEMANSKE, R. F.; BUSSE, W. W. asthma: factors underlying inception, exacerbation, and disease progression. *J. allergy clin Immunol* 2006: S456-61.

LERIVRAY, H.; CHESNEL, A.; JEGO, P. Identification and localization of lectin in the oviduct of various urodele amphibians. **Comparative Biochemistry and physiology**, v. 81 B, p. 385-91, 1985.

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. Royal Garden, Kew, Inglaterra, 1987. P. 369.

LIMA, E. C.; CURY, A. E.; FISCHMAN, O. G.; GIESHRECHT, A. M.; PAULO, O. G. Atividade antifúngica de extratos de plantas medicinais sobre *Trichophyton Microsporum e Epidermophyton* isolados de pacientes com dermatofitoses. **13 th Brazilian Symposium in Medicinal Plants**. Ceara, Brazil, 1994.

LIU, C.; ZHAO, X.; XU, X-C.; LI, L-R.; LIU, Y-H.; ZHONG, S-D.; BAO, J-K. Hemagglutinating activity and conformation of lactose-binding lectin from mushroom *Agrocybe cylindracea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 138-44, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. Ed., v. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002, p. 162.

LUENGO, M. B. uma revisão histórica dos principais acontecimentos da imunologia e da farmacologia na busca do entretimento e tratamento das doenças inflamatórias. **Revista eletrônica de farmácia**, v.2, p. 64-72, 2005.

LUO, Y. YIN, W.; SINGNORE, A. P.; ZHANG, F.; HONG, Z.; WANG, S.; GRAHAM, S. H. CHEN, J. neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferators-activated receptor- γ agonist rosiglitazone. **J. neurochem**. 97, 435-448. 2006.

MACFARLANE, B. V.; WRIGHT, A.; CALLAGHAN, J.; BENSON, H. A. E. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacology & therapeutics**, 75, p. 1-19, 1997.

MCQUAY, H. J. neuropathic pain: evidence matters. **European journal of pain**, 6 (suppl.), p. 11-18, 2002.

MIYAZAKI, S.; MATSUKAWA, A.; OHKAWARA, S.; TAKAGI, K.; YOSHINAGA, M. neu-trophil infiltration as a crucial step for monocyte chemoattractant protein (MCP-1) to attract monocytes in lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits. **Inflamm Res.** 49:673-678. 2000.

MOURA, R. M. et al. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and physiology A**, v. 145, n. 4, p. 517-523, 2006.

MURAYAMA, K.; TAKA, H.; KAGA, N.; FUJIMURA, T.; MINEKI, R.; SHINDO, N.; MORITA, M.; HOSONO, M.; NITTA, K. the structure of *Slurus osotus* (Catfish) rose lectin (SAL): identification of a noncovalent trimer by mass Spectrometry and Analytical Ultracentrifugation. **Analytical ultracentrifugation**. Analytical Biochemistry, v. 247, p. 319-26, 1997.

NAKAMURA, E. L. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, JR. F. Cancer chemopreventive effects of a brasilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 135 – 137, 2002b.

NASCIMENTO, M. P. S. C. B.; OLIVEIRA, M. E.; MIURA, C. L. Q.; REIS, J. C. B.; NASCIMENTO, H. T. S.; LEITE, J. M. B.; LOPES, J. B.; RIBEIRO, V. Q. potencial forrageiro do pau ferro. In: boletim de pesquisa e desenvolvimento, 41. Teresina: Embrapa, outubro, 2002. 16 p.

NGAI, P. H. K.; NG, T. B. A mushroom (*Gonoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. **Biochemical and Biophysical research communications**, v. 314, p. 988-93, 2004.

NUNES, D. N.; KOWALSKI, Luiz Paulo ; SIMPSON, Andrew Jg . Circulating tumor derived DNA may permit the early detection of head and neck squamous cell cancer. . **International journal of cancer**. Journal international du cancer, v. 92, n. 2, p. 214--219, 2000.

OKAGIMA, K. HARADA, N. regulation of inflammatory responses by sensory neurons: molecular mechanisms and possible therapeutic applications. **Curr. Med. Chem.** 13(19): 2241-2251. 2006.

OLIVEIRA, J. T. A.; MELO, V. M. M.; CAMARA, M. F. L.; VASCONCELOS, I. M.; BELTRAMINI, L. M.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M.; PEREIRA, S. P.; FERNANDES, C. F.; NUNES, E. P.; CAPISTRANO, G. G. G.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 301-310, 2002.

OLIVEIRA, M. D. L. ; CORREIA, Maria Tereza dos Santos ; Diniz, F.B. . Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 1, p. 1, 2009.

OSABEDE, P. O.; OKOY'E, F. B. C.; antiinflammatory affects of crude methanolic extract and fractions of alchornea leaves. *Journal of ethnopharmacology* 89, 19-24. 2003.

OURTH, D. D.; NARRA, M. B.; CHUNG, K. T. Isolation of mannose-binding C-type lectin from *Heliothis virescens* pupae. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 335, p. 1085-9, 2005.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 36, p. 113. 1992.

PARK, C. C.; BISSEL, M. J. & BARCELLOSHOFF, M. H. 'The influence of the microenvironment on the malignant phenotype', in *Molecular Medicine Today*, v. 61, p. 324, 2000.

PENNA, J. F. M. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. 3. Ed. Rio de janeiro: komos, 1946.

PERISSINOTTI, D. M. N. Dor psicogenetica. In: TEIXEIRA, M. J.; FIGEUIRÓ, J. A. B. **Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo editoria moreira Jr., 2001. P. 82-85.

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 versateli proteins with important perspective in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Rewiews**, v. 15, p. 199-228, 1998.

PIO CORRÊA, M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: imprensa national, p. 687, 1984.

PLEUVRY, B. J.; LAURETTI, G. R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacology & therapeutics**, 71, p. 313-324, 1996.

PRADO, W. A. Neurofisiologia e neuroquimica da dor aguda e cronica. In: ANDRADE FILHO, A. C. C. (editor). *Dor: diagnostico e tratamento*. 1. Ed. São Paulo: Roca, 2001. p. 1-5.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; HITER, J. M. agentes antiinflamatórios e imunossupressores. In: **Farmacologia**, editora Guanabara Koogan, 4ª edição, p. 189-190, 2003.

REDDY, S.; SHANTI, B. F. Cancer pain: assessment and management a multidisciplinary approach offers the best solution to the complex phenomenon of cancer pain. *Primary Care & Cancer* 2000;20(7):44-52.

REYNOSO-CAMACHO, R.; DE MEJIA, E. G.; LOARCA-PINA, G. purification and acute toxicity of a lectin extracted from therapy bean (*Phaseolus acutifolius*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 21-7, 2003.

ROBERTS II, L. J.; MORROW, J. D. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMA, A. G. (editors). **Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics**. 10. Ed. New York: McGraw- Hill, 2001. P. 817-731.

SANTOS, A. F. S.; ARGOLO, A. C. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. detection of water soluble lectin and antioxidant component from Moringa oleifera seeds. *Water Research*, v. 39, p. 970 – 985, 2005.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. **FASEB Journal**, v. 4, p. 3198 – 3208, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. A century of lectin research. **Trends in Biochemical Science**, v. 12, p. 488-91, 1988.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14: 53 – 62. 1989.

SILVA, A. C. C. **Avaliação das atividades antitumoral, antiinflamatória e analgésica do extrato e de uma fração parcialmente purificada da vagem de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex tul. var. *férrea***. Recife: UFPE, 2008. (Dissertação para obtenção do título de Mestre em Bioquímica – Departamento de Bioquímica – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco). 73p.

SIMMONS, D. L. what makes a good antiinflammatory drug target? **Revista**. Volume 11, number 5/6. P. 210-219, 2006.

SORENSEN, G. L.; HUSBY, S.; HOLMSKOV, U. Surfactant protein a and surfactant protein D variation in pulmonary disease. **Immunology**, v. 212, p. 381-416, 2007.

SOSA, S.; BALICK, M. J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R. G.; PIZZA, C.; ALTINIER, G.; TUBARO, A. Screening of the tropical antiinflammatory activity of some central american plants. **Journal of ethnopharmacology**, 81, p. 211-215, 2002.

SOULLEUX, E. J.; COLEMAN, N. Medicine in focus. Transplacental transmission of HIV: a potential role for HIV binding lectins. **The journal of Biochemistry & cell Biology**, v. 35, p. 283-87, 2003.

STEVENS, A.; LOWE, J. Patologia. 2. Ed. Barueri: manole, 2002, 655 p.

SUN, W-D; FU, L-D; JIA, Y-P; DU, X. J.; WANG, Q.; WANG, Y-H, ZHAO, X-F; YU, X-Q; WANG, J-X. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. **Molecular immunology**, v. 45, p. 348-61, 2008.

SYED, F. B. F.; JOSHI, B. N.; SIVARAMAN, H.; KHIRE, J. M.; KHAN, M. I. Purification and characterization of a cell-surface lectin (lectin II) from *Agrobacterium radiobacter* NCIM 2443. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 47, p. 361-7, 1999.

TAKAHASHI, K. G.; KURODA, T.; MUROGA, K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. **Comparative Biochemistry and Physiology part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, p. 45-52, 2008.

TEIXEIRA, M. J. anatomia e fisiologia das vias nociceptivas e supressoras da dor. In: TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo editoria moreira Jr., 2001b. p. 14-40.

THOMAS, G.; ARAUJO, C. C.; SOUZA, P. S. Avaliação das atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética dos extratos aquosos de *Caesalpinia ferrea*, *Plantago major*, *Polygonum acre* e *Pterodon polygaeflorus*. **10th Brazilian Symposium in Medicinal Plants**. São Paulo, Brasil, 1988.

TLSTY, T. D. & HEIN, P. W. 'Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals', in *Current Opinon in Genetics & Development*, v. 11, p. 54, 2001.

TURK, D. C.; MELZACK, R. **The measurement of pain and the assessment of people expeiriencing pain. Handbook of pain assessment**. New York london: the guilford press, 1992, p. 3-12.

TURK, D. C.; OKIFUJI, A. pain terms and taxonomies of pain. In LOESER, J. D.; BUTLER, S. H.; CHAPMAN, C. R.; TURK, D. C. (editors). *Bonica's management of pain*. 3. Ed. Philadelphia: lippincott Williams & Wilkins, 2001. P. 17-25.

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

WALLACE, J.; CHIN, B. *Curr. Opin. in CPNS. Investigational drugs*, 1, 132, 1999.

WANG, H. X.; NG, T. B. Concurrent isolation of a kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from the *Pseudostellaria heterophylla* roots. **Biochemical and Biophysical research communications**, v. 342, n. 1, p. 349-353, 2006.

WANG, H. X.; NG, T. B.; LIU, Q. A novel lectin from the wild mushroom *Polyporus adusta*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, p. 535-539, 2003.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Princípios gerais no tratamento da inflamação. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. (editores). **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004a. p. 294-295.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Antiinflamatórios esteróides. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. (editores). **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004b. p. 307-322.

WONG, J. H.; NG, T. B. Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, p. 545-550, 2003.

WOOLF, C. J.; MARNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, 353, p. 1959-1964, 1999.

XIMENES, N. C. A. **Purificação e Caracterização da Lectina da Vagem de *Caesalpinia ferrea* (CfePL): Aplicação Biológica**. Recife: UFPE, 2004. (Dissertação para obtenção do título de Mestre em Bioquímica – Departamento de Bioquímica – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco). 53 p.

XIMENES, N. C. A. **Caracterização e Avaliação de Atividades Biológicas da Lectina da Vagem de *Caesalpinia ferrea* (CfePL)**. Recife: UFPE, 2009. (Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas – Departamento de Ciências Biológicas – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco). 122 p.

YAMAGUCHI, M.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; KAMIO, Y.; JIMBO, M.; KAMIYA, H. Isolation and characterization of a mannan-binding lectin from the freshwater cyanobacterium (*Blue-Green Algae*) *Microcystis viridis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 265, p. 703-708, 1999.

YANG, H.; LUO, T.; LI, S.; XU, X. Purification and characterization of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of shrimp *Penaeus japonicas*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 88-97, 2007.

YE, X. Y.; NG, T. B. Purification and characterization of glycolactin, a novel glycoprotein from bovine Milk. **Life Science**, v. 66, p. 1177-1186, 2000.

YOSHIOKA, T.; FULITA, T.; KANAI, T. et al. studies on hindered phenols and analogues. 1. Hipolipdemic and hypoglyceic agents wuth a bility to inhibit lipid peroxdation. **J. Med. Chem.**; 32: 421-428. 1989.

ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic res. Cardiol.** 103(5): 398-406. 2008.

ZHANG, L.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Role of nitric oxide in parkinson's disease. **Pharmacology & therapeutics**, 109, 33-41. 2006.

ZHAO, B.; SANATI, S.; ELTORKY, M. Diaphragm disease: complete small bowel obstruction after long-termnonsteroidal antiinflammatory drugs usea case report and rewiew of titerature. **Annals of diagnostic pathology**. v. 9; 169-173. 2005.

4. ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA



**Purificação, caracterização e avaliação de atividades biológicas de
preparações lectínicas de folha de *Caesalpinia ferrea***

Sandro N. Silva¹, Andrea K. S. F. Silva¹, Neila C. A. Ximenes¹, Luana C. B. B. Coelho¹,
Terezinha G. Silva², Maria T. dos S. Correa^{1*}

¹*Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife – PE – CEP: 50670-901, Recife, PE.*

²*Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife – PE – CEP: 50670-901, Recife, PE*

E-mail: terezacorreia.ufpe@gmail.com, Tel./Fax: + 55-81-2126-8354

RESUMO: A *Caesalpinia ferrea* é uma planta de grande importância terapêutica utilizada na medicina popular, muito encontrada no Brasil é bem distribuída no Nordeste brasileiro, surgindo, portanto o interesse em purificar, caracterizar e testar a atividade antitumoral, antiinflamatória e analgésica de preparações lectínicas de folhas *C. ferrea*. Foram utilizados extrato bruto (EB) e a lectina CfeLL (*Caesalpinia ferrea* Leaves Lectin) purificada a partir do extrato, em coluna de quitina. EB e CfeLL apresentaram inibição da atividade hemaglutinante (AH) para N-acetil-D-Glicosamina, fetuína e soro fetal bovino. CfeLL foi estável a tratamentos com temperaturas elevadas, mantendo sua atividade a 100° C e frente a diferentes valores de pH; cálcio e magnésio não influenciaram sua AH. A observação de uma banda por eletroforese para proteínas nativas, básicas demonstra a natureza básica de CfeLL; nenhuma banda foi observada por eletroforese para proteínas nativas, ácidas. EB e CfeLL (50 mg/kg) inibiram em 43,45% e 41,12% de crescimento do tumor sarcoma-180, respectivamente, enquanto observou-se uma atividade antiinflamatória em modelo de carragenina de 48,3% e 46,4% para EB e CfeLL (100 mg/kg), respectivamente. Os estudos analgésicos com ácido acético revelaram 63,4% e 53,5% nas doses de 30 mg/kg tanto para EB quanto para CfeLL. Os resultados revelam uma lectina estável a valores de pH, termoresistente, de fácil obtenção; EB e CfeLL apresentam promissoras aplicações biológicas tais como, inibição de tumores, atividade antiinflamatória e analgésica, evidenciando o potencial uso popular dessa planta para tratamento de tumores e em processos antiinflamatórios.

Unitermos: *Caesalpinia ferrea*, lectinas, purificação de proteínas, câncer, antiinflamatório, analgesia.

ABSTRACT: “Purification, characterization and evaluation of biological preparations *Caesalpinia ferrea* leaves lectins”.

Caesalpinia ferrea plant is a very important therapy used in folk medicine widely found in Brazil is well distributed in northeastern Brazil, rising interest therefore to purify, characterize and test the biological activity of *C. ferrea*. We used aqueous extracts of the plant and the lectin CfeLL (*Caesalpinia ferrea* Leaves Lectin) purified from the extract on a column of chitin. The extract and lectin were inhibition of haemagglutinating activity (HA) for N-acetyl-D-glucosamine, fetuin and fetal bovine serum. CfeLL was stable at elevated temperatures, keeping its activity at 100 °C; Ions do not influence the HA and are stable in variations of pH in the solution. The observation of a band by electrophoresis for basic native proteins demonstrate the basic nature of the CfeLL, no bands were observed by electrophoresis for native acidic proteins. Results showed an inhibition of 43.45% and 41.12% growth of the tumor with sarcoma-180 for EB and CfeLL (50 mg / kg), respectively. The anti-inflammatory activity in carrageenan model was 48.3% 3 46.4% for EB and CfeLL (100 mg / kg) respectively. Studies analgesics in acetic acid revealed 63.4% and 53.5% at doses of 30 mg / kg of both EB and the CfeLL. The results indicate a lectin-resistant, easily accessible, which according to the inhibition of tumors, inflammatory and analgesic activity observed for both the extract, and for the lectin, confirming the popular belief in the use of this plant for treatment of tumors and in inflammatory processes.

Keywords: *Caesalpinia ferrea*, lectins, purification of proteins, cancer, anti-inflammatory, analgesy.

INTRODUÇÃO

A *Caesalpineia ferrea* (pau-ferro; jucá) é uma planta nativa do Brasil bastante distribuída no Nordeste brasileiro, principalmente na região da caatinga, como nas cidades de Floresta e Ibimirim no estado de Pernambuco. Muito utilizada na medicina popular como anticéptico e cicatrizante, servindo no tratamento de doenças como gastrite e infecções pulmonares.

Lectinas são glicoproteínas que apresentam como principal característica a ligação de forma reversível e específica a carboidratos. Essas proteínas estão distribuídas em todos os grupos de seres vivos, microorganismos (Wang et al., 2003; Ngai e Ng, 2004; Goldstein et al., 2007; Liu et al., 2008), animais (Kanazawa et al., 2007; Takahashi et al., 2008; Yang et al., 2007; Sun et al., 2008; Sorensen et al., 2007; Moura et al., 2006) e em plantas, nessas as lectinas são obtidas de diferentes tecidos como sementes (Wang e Ng, 2003; Santos, 2009), folhas (Coelho e Silva, 2000), bulbos (Mo et al., 1993), casca (Sá et al, 2008a), raízes (Naeem et al., 2001) e vagens (Oliveira et al., 2003). Os estudos com lectinas revelaram seu potencial na prevenção do câncer (NAKAMURA et al., 2002a); como antitumoral (NAKAMURA et al., 2002b); como cicatrizante (PENNA, 1964; PIO CORRÊA, 1984; LEWIS, 1987); antiulcerogênica (BACCHI E SERTIE, 1994; BACCHI et al., 1995); atividade antiinflamatória (SILVA et al., 2008), entre outras atividades que tem sido descritos na literatura. Atualmente as lectinas são importantes utensílios da biotecnologia por se ligarem a carboidratos, podendo reconhecer carboidratos de membrana (Weis et a, 1996), auxiliar na purificação de glicoconjugados (Lima et al, 1997; Paiva et al., 2003) e servindo como meio para estudos medicinais (Banerjee et al., 2004; Mizuno et al., 2004; Sharon e lis, 2001).

O combate ao câncer tem sido o objetivo de grande parte dos trabalhos com plantas visando o tratamento dessa patologia (Newman et al., 2000, 2003; Butler, 2004). O

combate a essa doença tem se tornado um foco na medicina moderna e, o destaque para os produtos naturais está na tentativa de amenizar os efeitos do tratamento uma vez que os tratamentos para essa doença são muito invasivos e agressivos até mesmo afetando células normais do organismo. Mesmo drogas usadas em quimioterapia têm sua origem natural, sendo drogas isoladas de plantas e produtos naturais diversos (Van der Heijden et al., 2004; Costa-Lofuto et al., 2005). As plantas e os produtos naturais têm sido fontes valiosas de obtenção de produtos que combatem o câncer (Prozesky et al., 2001; Schwartzmann et al., 2002).

A elucidação das vias envolvidas no processo inflamatório foi um grande passo para o desenvolvimento de fármacos capazes de interromper a sinalização inflamatória. Embora cada fármaco antiinflamatório possua um mecanismo de ação própria o principal objetivo geral é o de impedir o agravamento da inflamação, não permitindo que ele se torne lesivo em extremo, evitando assim a potencialização da agressividade flogógena inicial (LEMANSKE e BUSSE, 2006).

A analgesia pode ser classificada como o estado em que o indivíduo não sente mais dor, através da interrupção dos impulsos nociceptivos (BATISTETTI, 2001). A associação internacional de estudos da dor define a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável que primariamente associamos a lesão tecidual ou a descrevemos em termos desta lesão ou ambos” (IASP, 2004). Geralmente a dor é associada à inflamação como um processo secundário originado pela liberação de mediadores algícos (HUNSKAAR e HOLE, 1987; OSABEDE e OKOY'E, 2003).

O objetivo deste trabalho foi purificar; caracterizar parcialmente e avaliar a atividade antitumoral, antiinflamatória e analgésica de preparações lectínicas da folha de *Caesalpinia ferrea*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

As folhas de *C. ferrea* foram coletadas da cidade de Ibimirim no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.

Animais

Camundongos, fêmeas, Swiss albinos (*Mus musculus*) pesando aproximadamente 30 g (\pm 50 dias de nascidos), foram obtidos do biotério do Departamento de antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e mantidos sobre condições constantes (temperatura: 23 ± 2 °C, umidade: 40-60%, ciclo de 12 h claro/ 12 h escuro). Os camundongos foram alimentados com uma dieta padrão para roedores (Purina[®]) e água. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, Brasil (CEEA – UFPE).

Ensaio de atividade hemaglutinante (AH) e inibição da AH

Foram usados eritrócitos de humanos (A, B, O e AB) e de coelhos obtidos como descritos por BUKANTZ et al (1946) e, tratados com glutaraldeído de acordo com Bing et al (1997). A atividade hemaglutinante (AH) foi avaliada de acordo com Correia e Coelho (1995) definida pela diluição das amostras, que apresentam hemaglutinação; a AH específica (AHE) corresponde a AH dividida pela concentração da proteína (mg/ml). A determinação da concentração de proteínas foi desenvolvida de acordo com Lowry et al (1951). A ligação específica a carboidratos foi desenvolvida pela inibição da AH usando os açúcares (100 mM):

N-acetil-D-glucosamina, manose, glicose, sacarose ou, glicoproteínas (0.5 mg/ml): fetuína, ovoalbumina, caseína e soro fetal bovino, de acordo como descrito por Coelho e Silva (2000).

Purificação da lectina

As folhas de *C. ferrea* foram lavadas em água destilada, secas em temperatura ambiente, trituradas em multiprocessador. Extrato a 10% (w/v) em tampão citrato-fosfato 10 mM, pH 6,5 (TCF) foi obtido por agitação durante 16 h, em temperatura ambiente. O extrato foi filtrado, centrifugado a 10.000 x g durante 15 min e coletado o sobrenadante, obtendo-se o extrato bruto (EB), foram efetuadas 10 (dez) repetições para a extração. Amostras de EB foram incubadas (30 min) com quitina (Sigma), equilibradas com TCF para serem aplicadas a colunas cromatográficas (5,0 x 1,5 cm). Proteínas adsorvidas a matriz foram eluídas com Ácido acético 1 M. As frações coletadas que apresentaram AH foram reunidas, dialisadas (CfeLL) e armazenadas a uma temperatura de -20 °C.

Efeito da temperatura, pH e íons na AH de CfeLL

AH de amostras de CfeLL foram determinadas após as mesmas serem submetidas a incubações por 30 min em temperaturas definidas (30 – 100 °C). Diferentes soluções de pH (Tampão citrato-fosfato pH 2,0 – 4,5; Tampão fosfato de sódio, pH 5,0 – 8,0; Tampão Tris-HCl, pH 8,5 – 10 e NaOH, pH 10 – 11) e (c) soluções de CaCl₂ ou MgCl₂ (0.01 – 0.04 M) foram usadas para diluição de amostras de CfeLL em ensaios de AH. A AH para todos os ensaios foi efetuada após incubação de cada amostra por 45 min, utilizando os eritrócitos tratados de coelho.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

PAGE para proteínas nativas, básicas ou ácidas foram efetuados como descrito por Reisfeld et al (1962) e Davis (1964), respectivamente. Amostras desnaturadas foram reduzidas ou não, em presença de SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970).

Atividade antitumoral

Os estudos foram feitos com seis camundongos em cada grupo, sendo analisada a atividade antitumoral *in vivo* de EB e CfeLL frente ao sarcoma-180.

As dosagens de EB, CfeLL e Metotrexato (MTX), (30 e 50 mg/kg para EB e CfeLL; e 2.5 mg/kg de MTX). Foram implantadas células malignas (sarcoma-180) e, após oito dias de implantação os camundongos, portadores de tumor, foram previamente higienizados em uma sala de cirurgia experimental e anestesiados para a aspiração do tumor. O tumor em sua forma ascítica foi introduzido sob a axila direita dos animais receptores. O tratamento via i. p. foi iniciado 24 h após o implante, por 7 dias. O grupo controle negativo recebeu apenas o veículo (solução salina) e o grupo padrão (positivo) recebeu MTX a droga antitumoral de referência. No oitavo dia, os animais foram sacrificados e os tumores sólidos foram excisados e pesados. A inibição do tumor foi expressa pela comparação do grupo de animais tratados (T) em comparação ao grupo de animais controles negativo, não tratado (C). A inibição do tumor foi calculada de acordo com: percentual de inibição do tumor [T_{WI} (%)] = $[(C - T) / (C)] \times 100$. Os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo do NCI (Geran et al., 1972).

Ensaio antiinflamatório – peritonite induzida por carragenina

Solução salina (NaCl 0,15 M), dexametazona (2 mg/kg), piroxicam (3 mg/kg) e indometacona (10 mg/kg), bem como as amostras em estudo EB e CfeLL (30, 50 e 100 mg/kg), foram administradas por via oral nos respectivos grupos (6 animais por grupo). Após 1 h da administração, 0,25 ml de solução de carragenina (1%) em solução salina (agente flogístico) foi injetada i.p. Decorridas 4 h, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e submetidos à cirurgia por abertura abdominal (Grupta et al., 2005). A cavidade peritoneal foi lavada com 2 ml de solução salina contendo EDTA. O exsudato foi coletado e os leucócitos polimorfonucleares foram contados em câmara de Neubauer.

Atividade analgésica – contorções abdominais induzidas por ácido acético

A resposta à injeção i.p. de solução de ácido acético, manifestada por contrações do músculo do abdômen e estiramento da parte posterior do corpo foi avaliada usando adaptações do método de Young et al. (2005). Animais (6 por grupo) foram pré-tratados com as amostras em análise EB e CfeLL (30, 50 e 100 mg/kg), 1 h após foi administrado a solução de ácido acético (1%), com volume de 0,1 ml para cada 10g de peso do animal. Aguardado um período de 10 min o número de contrações e estiramentos foram contados por um período de 20 min.

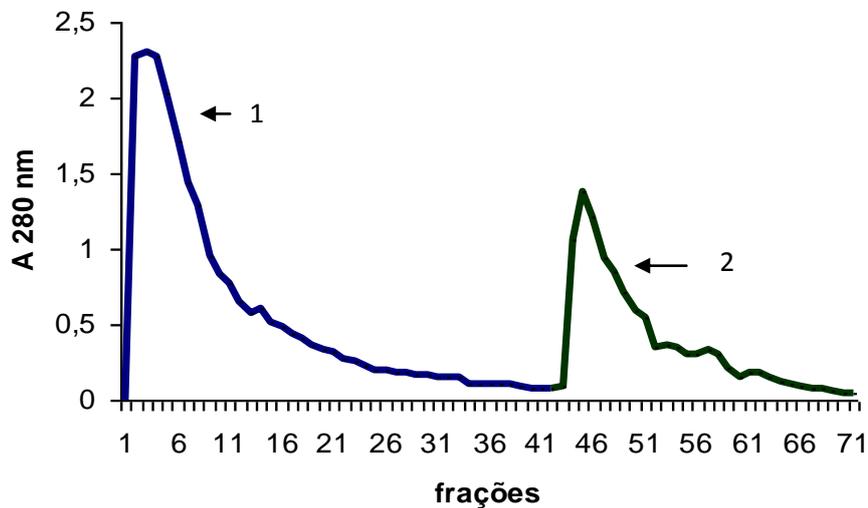
Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média \pm S.E.M. e estatisticamente avaliados através do ANOVA (Origin[®] 5.0). Foi considerado significativo $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma lectina da folha de *C. ferrea* foi purificada em coluna de quitina (figura 1) a partir de EB (concentração protéica de 70 mg/ml e AH de 4096). A lectina (CfeLL) obtida por eluição com ácido acético (concentração protéica de 0,5 mg/ml e AH de 128) apresentou AHE bem superior ao extrato (tabela 1).

Figura 1: Cromatografia de EB em coluna de quitina.



O não adsorvido não apresentou AH (1); absorvância a 280 nm. A seta 2 indica a eluição por ácido acético 1M tendo apresentado AH nas frações coletadas de 44 a 53; absorvância 280 nm.

Tabela 1: purificação de CfeLL

Rendimentos e atividades hemaglutinantes das frações diversas (10g de farinha de trituração de folha de *Caesalpinia ferrea*)

mostra	volume (ml)	Proteína			AH	purificação (X)
		(m)	H	E		
B	0	7	69.	096	76	58.

feLL	7	0.5	28	256	4	4,

CfeLL manteve sua AH estável até 100 °C por um período de 30 min (figura 2A). Quando incubada em presença de íons Mg^{2+} e Ca^{2+} (figura 2B) não houve uma alteração relevante em sua AH. Além de eritrócitos de coelho CfeLL aglutinou eritrócitos humanos (A, B, AB e O) observando-se uma elevação na AH com sangue humano tipo A, da mesma forma uma diminuição no sangue tipo AB, o sangue B e o de coelho apresentaram a mesma atividade e o tipo O apresentou uma redução na AH (figura 2C). A AH de CfeLL não variou entre os pH 4,5 e 6,0 e em pH 10,0, no entanto sua Ah foi decrescendo em pH 6,5 a 8,5, apresentando sua mínima AH em pH 9,0 (figura 2D).

A eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas nativas, básicas (dados não mostrados), revelou o caráter básico de CfeLL, mostrando também a purificação de CfeLL. PAGE para proteínas nativas, ácidas não revelou nenhuma banda para EB ou CfeLL.

Algumas lectinas têm sido isoladas por cromatografia de quitina, no entanto, necessitam de etapas de purificação parcial para suas obtenções (Franco-Fraguas et al., 2002; Freire et al., 2002; Sá 2008a). A termoresistência é uma característica comum em lectinas obtidas de plantas nativas do nordeste brasileiro (Costa et al., 2009; Vaz et al., 2010). Lectinas, como a obtida de *Talissa esculenta*, podem ter sua AH estimulada por Ca^{2+} (Freire et al., 2002) e, algumas demonstram preferência em aglutinar sangue tipo AB e O como as, de *T. esculenta* e *Sphenostyles stenocarpa*, respectivamente (Freire et al., 2002; Machuca et al., 1999). Portanto, a obtenção de CfeLL por apenas uma etapa de purificação e sua estabilidade frente a altas temperaturas e variações de pH, revela uma nova lectina ligadora de quitina com características similares às já estudadas, e estas características estimularam seus estudos em aplicações biológicas *in vivo* e *in vitro*, bem como EB, uma vez que é na forma de extrato que a população utiliza os diferentes tecidos de *C. ferrea* na medicina popular.

Nos ensaios de atividade antitumoral observou-se que EB nas doses de 30 e de 50 mg/kg, apresentou uma inibição do crescimento tumoral em 24,3% e 43,5%, respectivamente, em relação ao grupo controle negativo, enquanto que MTX (controle positivo) apresentou uma inibição de 72% (figura 3A). CfeLL na dose de 50 mg/kg apresentou uma inibição de 41% de crescimento do tumor (figura 3B). Hu et al. (2002) demonstraram que o extrato alcoólico de *Ganoderma Lucidum* induzia apoptose de células cancerosas humanas da linhagem MCF-7. Nakamura et al. (2002b) isolaram duas proteínas da vargem de *C. ferrea* testando suas atividades antitumoral em ratos, detectaram uma diminuição do número de papilomas. Grupta et al. (2004), também, avaliaram extratos metanólicos de *Caesalpinia boducella* quanto ao seu efeito antitumoral. Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que o extrato e a lectina estudados obtidos de folha de *C. ferrea* possuem atividade antitumoral, portanto apresentam potenciais anticarcinogênicos.

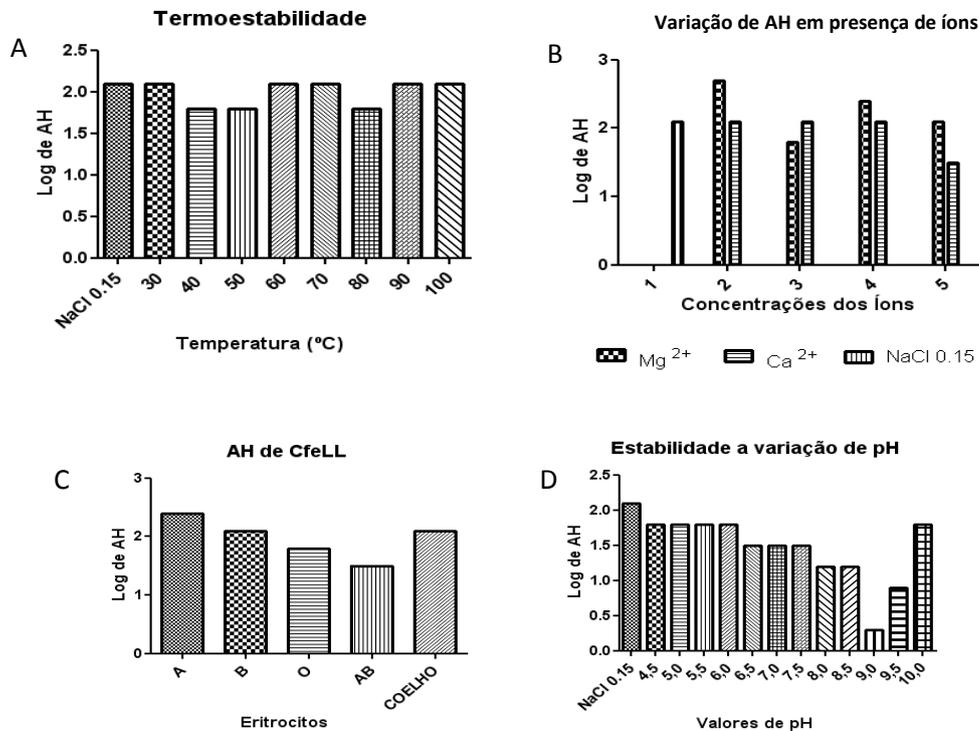
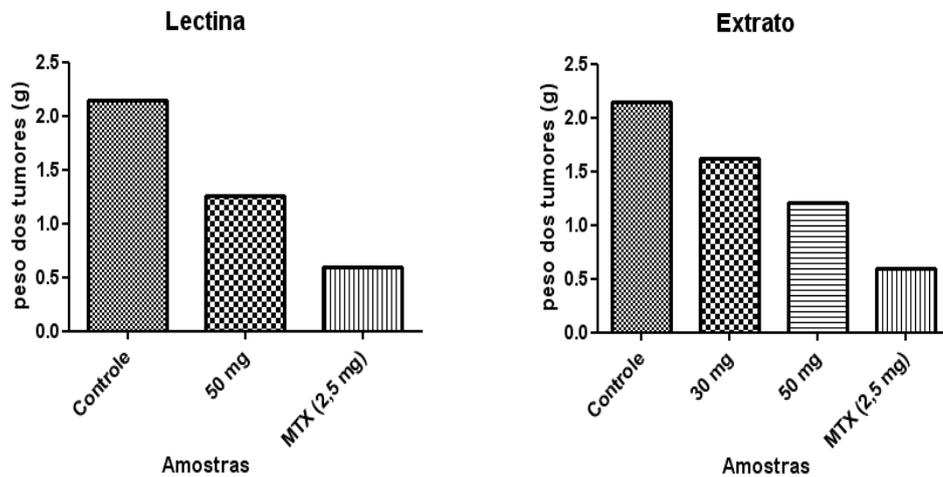


Figura 2: Variação da AH de CfeLL em função: da temperatura (A); da presença dos íons (B) Mg²⁺ e Ca²⁺ (1: NaCl, 0,15 M; 2: 40 mM; 3: 20 mM; 4: 10 mM; 5: 5 mM); de eritrócitos humanos e de coelho (C) e de diferentes valores de pH (D)

Figura 3: Atividade antitumoral de EB (A) e de CfeL (B)



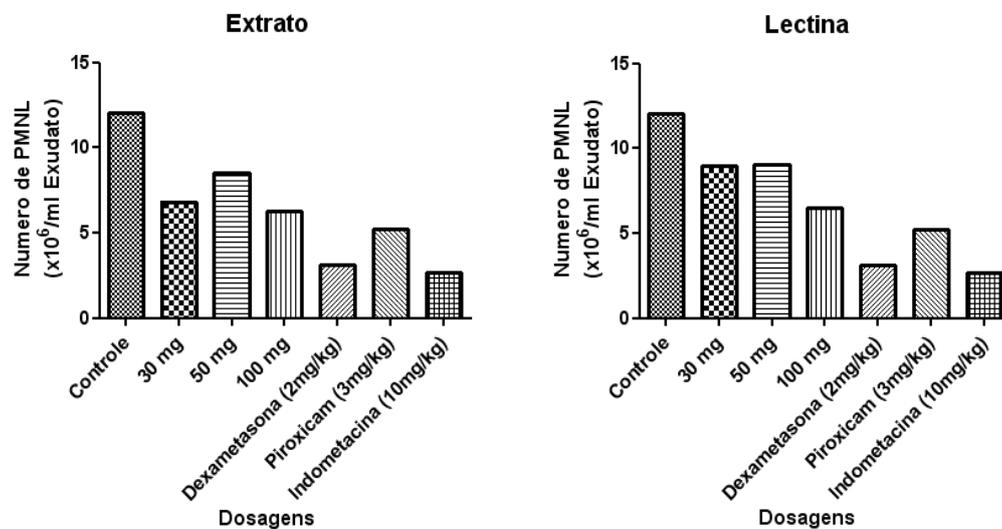
Entre os agentes flogísticos disponíveis (como a dextrana, a bradicinina, β -glucanas, etc), carragenina é talvez o mais utilizado e estudado em ensios de atividade antiinflamatória (Leme et al., 1973), uma vez que produz um edema máximo em 3 h, associado com a ativação da via ciclooxigenase e é sensível aos glicocorticóides e antagonistas da síntese das prostaglandinas (DiRosa et al., 1971).

Nas concentrações de 30, 50 e 100 mg/kg EB inibiu a inflamação induzida por carragenina em 43,5, 29,6 e 48,3% respectivamente, comparados com o controle negativo, enquanto os controles positivos dexametasona, piroxicam e indometacina inibiram 74,5, 55,3 e 76%, respectivamente (figura 4A). CfeLL nas concentrações de 30, 50 e 100 mg/kg apresentou inibição de 25,8%, 25,1% e 46,4%, respectivamente (figura 4B). De acordo com Kelly et al. (2007) há um crescente otimismo de que a inibição do recrutamento de leucócitos pode impedir a inflamação inapropriada. Assim, a procura por medicamentos que atuam sobre a migração celular pode ser de grande interesse. Carvalho et al. (1996) efetuaram estudos antiinflamatórios em ratos, com um extrato de *C. ferrea* em água, usando indução por carragenina e observaram revelaram que o extrato reduziu a formação de edemas

significativamente nos primeiros momentos. Os estudos efetuados com EB e CfeLL mostraram que nas doses mais elevadas houve uma significativa ação antiinflamatória, muito próximo do potencial antiinflamatório da dexametasona.

A indução da dor por ácido acético ocasiona dor visceral e envolve diferentes mecanismos nociceptivos, como a liberação de metabólitos do ácido araquidônico via ciclooxigenase e biosíntese de prostaglandinas, mecanismos opióides, receptores peritoneais locais e mediadores relacionados à acetilcolina e histamina, além disso, de mediadores do sistema simpático (Collier et al., 1968; Takahashi e Paz, 1987; Duarte et al., 1988; Franzotti et al., 2000; Park et al., 2005; Koo et al., 2006).

Figura 4: Atividade Antiinflamatória de EB (A) e de CfeLL (B)

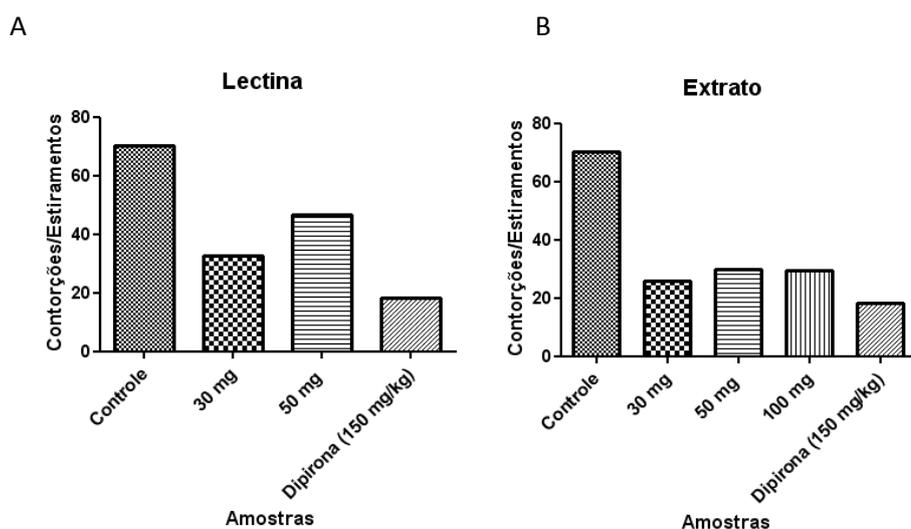


Os ensaios efetuados com EB nos estudos de analgesia mostraram que para as doses de 30, 50 e 100 mg/kg houve uma atividade analgésica de 63,4, 57,5 e 58, respectivamente (figura 5A) respectivamente, enquanto que CfeLL (figura 5B) apresentou atividade analgésica de 53,5 e 33,7% para as doses de 30 e 50 mg/kg, respectivamente, ambos em relação ao controle negativo. A dipirona (150 mg/kg), controle positivo apresentou

analgesia de 72,6%. Os resultados mostraram que a atividade analgésica de EB e CfeLL foram superiores nas dosagens mais baixas, demonstrando que uma baixa quantidade da droga é suficiente para resultar no efeito analgésico. Na concentração de 30 mg/kg CfeLL e principalmente EB apresentaram analgesia próxima aos valores da dipirona. Além da necessidade de baixas doses as preparações lectínicas apresentam o benefício de serem obtidas de um produto natural.

A purificação de CfeLL, lectina obtida por um método eficiente, com apenas uma etapa de purificação e com baixo custo para a sua eluição; estável a variações de temperaturas e pH, abre caminhos para sua utilização em diferentes aplicações biológicas, uma vez que os resultados obtidos nos estudos de atividade antitumoral, antiinflamatória e analgésica revelaram o seu potencial como molécula biologicamente ativa, possibilitando novas perspectivas para o uso das folhas de *C. ferrea*, planta bastante utilizada na medicina popular.

Figura 5: Efeito analgésico de EB (A) e de CfeLL (B)



REFERÊNCIAS

- Wang, H. X.; NG, T. B.; Liu, Q. A novel lectin from the wild mushroom *Polyporus adusta*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 307, p. 535-539, 2003.
- Ngai, P. H. K.; NG, T. B. A mushroom (*Gonoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochemical and Biophysical research communications*, v. 314, p. 988-93, 2004.
- Goldstein, I. J.; Winter, H. C.; Aurandt, J.; Confer, L.; Adamson, J. T.; Hakansson, K.; Remmer, H. A new α -galactosyl-binding protein from the mushroom *Lyophyllum decastes*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 467, p. 268-74, 2007.
- Liu, C.; Zhao, X.; XU, X-C.; LI, L-R.; Liu, Y-H.; Zhong, S-D.; Bao, J-K. Hemagglutinating activity and conformation of lactose-binding lectin from mushroom *Agrocybe cylindracea*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 42, p. 138-44, 2008.
- Kanazawa, N. Dendritic cell immunoreceptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *Journal of Dermatological Science*, v. 45, p. 77-86, 2007.
- Takahashi, K. G.; Kuroda, T.; Muroga, K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 150, p. 45-52, 2008.
- Yang, H.; Luo, T.; LI, S.; XU, X. Purification and characterization of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of shrimp *Penaeus japonicas*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 22, p. 88-97, 2007.
- Sun, W-D; FU, L-D; Jia, Y-P; DU, X. J.; WANG, Q.; WANG, Y-H, ZHAO, X-F; YU, X-Q; Wang, J-X. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Molecular immunology*, v. 45, p. 348-61, 2008.
- Sorensen, G. L.; Husby, S.; Holmskov, U. Surfactant protein a and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunology*, v. 212, p. 381-416, 2007.
- Moura, R. M. et al. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. *Comparative Biochemistry and physiology A*, v. 145, n. 4, p. 517-523, 2006.

- Wang, H. X.; NG, T. B. Coucurrent isolation of a kunitz-type trypsin anhibitor with antifungal activity and a novel lectin from the *Pseudostellaria heterophylla* roots. *Biochemical and Biophysical research communications*, v. 342, n. 1, p. 349-353, 2006.
- Coelho, L. C. B. B.; DA Silva, M. B. R. simple method to purify miligram quantities of the galactose – specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*, v. 11, 295 – 300, 2000.
- Nakamura, E. L. S.; Kurosaki, F.; Arisawa, M.; Mukainaka, T.; Takayasu, J.; Okuda, M.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Pastore, JR. F. Cancer chemopreventive effects of a brasilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 135 – 137, 2002b.
- Penna, J. F. M. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. 3. Ed. Rio de janeiro: komos, 1946.
- Pio Corrêa, M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: imprensa national, p. 687, 1984.
- Lewis, G. P. *Legumes of Bahia*. Royal Garden, Kew, Inglaterra, 1987. P. 369.
- Bacchi, E. M.; Sertie, J. A. A. Anti-ulcer action of *Stryax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. *Planta Médica*, 60, p. 118 – 120, 1994.
- Bacchi, E. M.; Sertie, J. A. A. Anti-ulcer action and toxicity of *Stryax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. *Planta Médica*, 60, p. 118 – 120, 1995.
- Paiva, P. M. G.; Coelho, L. C. B. B. purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V. 36, p. 113. 1992.
- Banerjee, S.; Chaki, S.; Bhowal, J.; Chatterjee, B. P. Mucin binding mitogenic from freshwater Indian gastropod *Belamyia bengalensis*: purification and molecular characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 421, 125 – 134, 2004.
- Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B. Purification of glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnonology*, v. 55, p. 261 – 273, 1995.
- Santos, a. F. S.; Luz, L. A.; Argolo, A. C. C.; Teixeira, J. A.; Paiva, P. M. G.; Coelho, L. C. B. B., 2009. Isolation of a seed coagulalant moringa oleifira lectin. *Process Biochemistry*, doi: 1016/j.procbio.2009.01.002.

MO, H., Van damme, E. J. M., Peumans, W. J., Goldstein, I. J., 1993. Purification and characterization of a mannose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 306, 2, 431-438.

Sá, R. A., Napoleão, T. H., Santos, N. D. L., Gomes, F. S., Albuquerque, A. C., Coelho, L. C. B. B., Bieber, L. W., Paiva, P. M. G., 2008b. induction of mortality on *nasutitermes corniger* by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 460-464.

Naeem, A., Khan, R. H., Vikram, H., Akif, M., 2001. Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 396, 1, 99-105.

Oliveira, M. L., Beltramini, L. M., Simone, S. G., Brumano, M. H. N., Silva-Lucca, R. A., Nakaema, M. K. K., Pires, C. V., Oliveira, M. G. A., 2003. Purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia trinatoria* Domb, ex. Dc fruits. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 119-122.

Weis, W. I., Drickamer, K., 1996. Structural basis of lectin – carbohydrates recognition. *Animal Reviews in Biochemistry*, 65, 441-473.

Lima, V. L. M., Correia, M. T. S., Cechinel, Y. M. N., Sampaio, C. A., Owen, J. S. And Coelho, L. C. B. B., 1997. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins including lectin cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers*, 31, 892, 27-32.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. And Randall, R. J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265.

Mizuno, M., Noguchi, M., Imai, M., Motoyosh, T., Inazu, T., 2004, Interaction assay oligosaccharide with lectin lectins using glycosylasparagine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 14, 485 – 490.

Sharon, N., Lis, H., 2001. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2*. Taiwan, Kuwer Academic Plenum Publishers, 1 – 19.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-5.

Prozesky, E. A., Meyer, J. J., Louw, A. I. 2001. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected South African plants. *Journal of Ethnopharmacology* 76 (3), 239-245.

Schwartzmann, G., Ratain, M. J., Cragg, G. M., Wong, J. E., Saijo, N., Parkinson, D. R., Fuliwara, Y., Pazdur, R., Newman, D. J., Dagher, R., Di Leone, L., 2002. Anticancer drug discovery and development throughout the world. *Journal of clinical Oncology* 20 (18), 47S-59S.

Nakamura, E. L. S., Kurosaki, F., Arisawa, M., Mukainaka, T., Okuda, M., Tokuda, H., Nishino, H., Pastore Jr, F., 2002a. Cancer Chemopreventive affects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters* 177, 119-124.

Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M., 2000. The influence of natural products reports 17 (3), 215-234.

Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66 (7), 1022-1037.

Butler, M. S., 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products* 67 (12), 2141-2153.

Van der Heijden, R., Jacobs, D. I., Snoeijer, W., Hallard, D., Verpoort, R., 2004. The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Current Medicinal Chemistry* 11 (5). 607-628.

Costa-Lofuto, L. V., Khan, M. T. H., Ather, A., Wilke, D. V., Jimenez, P. C., Pessoa, C., Moraes, M. E. A., Moraes, M. O., 2005. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 21-30.

Bing, D. H., Weyand, J. M. Stanislawski, A. B., 1967. Hemmagglutination with aldehyde – fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. Soc. Cyp. Boil. Med.*, 124, 1166-1170.

Bukantz, C. S. C., Rein, L. C. C. R., Kent, J. F., 1946. Studies in complement fixation preservation of shepp's blood in dextrose mixtures (modified Alsever's solution) for use in the complement fixation reaction. *Journal of laboratory and clinical Medicine*, Saint Louis. 31, 349-399.

Reisfeld, R. A. et al., 1962. Disk electrophoresis of basic protein and paptides on polyarylamide gels. *Nature*, 195, 281-283.

5. CONCLUSÕES

- Uma lectina da folha da *C. ferrea* (CfeLL) foi purificada através de cromatografia em coluna de quitina a partir do extrato bruto (EB) por um protocolo simples;

- CfeLL aglutina tanto eritrócitos de coelho quanto de humanos, não necessita dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} para exercer sua atividade; é resistente a temperatura e sensível a faixa de pH entre 8,0 e 9,5, possui afinidade para N-acetil-D-glicosamina e glicoproteínas, sendo uma proteína básica;

- EB e CfeLL possuem atividade antitumoral ao tumor sarcoma-180;

- EB e CfeLL reduziram o número de leucócitos presentes na inflamação induzida por carragenina, indicando uma atividade antiinflamatória significativa;

- EB e CfeLL apresentaram significativa atividade analgésica.

6. ANEXOS

INSTRUÇÕES PARA AUTORES DO PERIÓDICO REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA.



NORMAS GERAIS

1.1 Todos os manuscritos submetidos devem ser inéditos. A publicação simultânea de manuscritos descrevendo o mesmo trabalho em diferentes periódicos não é aceitável. Os direitos de publicação passam a ser da **Revista Brasileira Farmacognosia**, inclusive traduções; publicações subsequentes são aceitas desde que citada a fonte.

1.2 A **Revista Brasileira Farmacognosia** recebe para publicação trabalhos científicos originais, revisões e divulgações escritos em Português, Espanhol ou Inglês. O conteúdo dos trabalhos é de total responsabilidade do(s) autor(es), e não reflete necessariamente a opinião do Editor Chefe ou dos membros do Conselho Editorial.

1.3 A **Revista Brasileira de Farmacognosia** submeterá todos os manuscritos recebidos à análise de consultores *ad hoc*, cujos nomes permanecerão em sigilo e que terão a autoridade para decidir sobre a pertinência de sua aceitação, podendo inclusive, reapresentá-los ao(s) autor(es) com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias e/ou para que os mesmos sejam adequados às normas editoriais da revista.

1.4 Toda idéia e conclusão apresentadas nos trabalhos publicados são de total responsabilidade do(s) autor(es), e não reflete necessariamente a opinião do Editor Chefe ou dos membros do Conselho Editorial.

1.5 Todos artigos envolvendo estudos com humanos ou animais deverão ter Pareceres dos Comitês de Ética de Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais das instituições a que pertencem os autores, autorizando tais estudos.

1.6 Todo material vegetal utilizado na pesquisa descrita no trabalho deve ter a indicação do seu local de coleta (inclusive coordenadas obtidas por GPS, se possível), o país de origem, o responsável pela identificação da espécie e a localização da exsicata. Os autores devem estar preparados para fornecer evidência documental de que a aprovação para a coleta foi concedida pela autoridade apropriada no país de origem.

2. NORMAS PARA A ELABORAÇÃO DAS CONTRIBUIÇÕES

2.1 Os autores devem manter uma cópia (eletrônica e impressa) do manuscrito submetido, para o caso de possível perda ou danos causados ao original enviado à revista.

2.2 As Figuras (fotografias, gráficos, desenhos, etc.) deverão ser apresentadas em folhas separadas e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As respectivas legendas deverão ser claras, concisas, sem abreviaturas e localizadas abaixo das figuras. Suas respectivas posições no texto deverão ser indicadas, preferentemente, logo após sua citação no corpo do trabalho. No caso de fotografias ou desenhos feitos a mão livre, estes deverão ser colocados em envelopes à parte, em perfeito estado e devidamente identificados no verso, a lápis.

2.3 As Tabelas e os Quadros deverão ser apresentados em folhas separadas e numerados consecutivamente em algarismos arábicos. As tabelas (dados numéricos) não podem ser fechadas por linhas laterais. As respectivas legendas deverão ser claras, concisas, sem abreviaturas e localizadas na parte superior dos mesmos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto, onde as tabelas e os quadros serão intercalados,

preferentemente, logo após sua citação no corpo do trabalho.

3. FORMATAÇÃO DO TEXTO E CONTEÚDO DO TRABALHO

3.1 Os originais deverão ser redigidos e digitados em folhas de papel tamanho A4 ou carta, espaço duplo, fonte tipo Times New Roman, tamanho 12, com texto justificado, margem de 2cm em cada um dos quatro lados, e perfazendo o total de, no máximo, 15 e, no mínimo, 5 páginas, incluindo figuras, tabelas e quadros.

3.2 Título e subtítulo: Deverão estar de acordo com o conteúdo do trabalho, levando em conta o âmbito e objetivos da Revista. Estes deverão estar escritos em caixa baixa, negritados, fonte tipo Times New Roman, tamanho 14. Para os trabalhos redigidos nas línguas Portuguesa e Espanhola, providenciar também versão do título para a língua Inglesa, o qual acompanhará o Abstract.

3.3 Autores: Os nomes dos autores devem vir abaixo do título, centralizados. O nome e os sobrenomes devem aparecer na ordem correta, sendo obrigatório que o primeiro (nome) e o último (sobrenome) apareçam por extenso (ex. Carlos N.U. Silva ou Carlos N. Ubiratan Silva). No caso de vários autores, seus nomes deverão ser separados por vírgulas.

3.4 Filiação dos autores: Após o nome de cada autor deverá constar um número Arábico, sobrescrito, que indica sua instituição de procedência e, deverá aparecer logo abaixo da nominata dos autores, também centralizado e com endereços completos, inclusive o CEP da cidade. Deve-se assinalar o nome do autor principal com um asterisco sobrescrito, para o qual toda correspondência deverá ser enviada. O endereço eletrônico, telefone e fax do autor principal aparecerão na primeira página do trabalho como uma nota de rodapé.

3.5 Resumo em português: Deverá apresentar concisamente o trabalho destacando as informações de maior importância, expondo metodologia, resultados e conclusões. Permitirá avaliar o interesse pelo artigo, prescindindo de sua leitura na íntegra. Dever-se-á dar destaque ao Resumo como tópico do trabalho (máximo de 200 palavras).

3.6 Unitermos: Deverão identificar/representar o conteúdo do artigo. Observar o limite máximo de 6 (seis). São importantes para levantamentos em banco de dados, com o objetivo de localizar e valorizar o artigo em questão. Deverão vir separados por vírgula.

3.7 Abstract: Os trabalhos redigidos nas línguas Portuguesa e Espanhola devem vir acompanhados também da versão do resumo para a língua Inglesa. Evitar traduções literais. Quando não houver domínio deste idioma, consultar pessoas qualificadas. O Abstract deve ser encabeçado por versão do título na língua inglesa.

3.8 Keywords: Unitermos em inglês. Também em número máximo de 6 (seis) e separados por vírgula.

3.9 Introdução: Deverá estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma área. Extensas revisões da literatura deverão ser substituídas por referências a publicações mais recentes, onde estas revisões tenham sido apresentadas e estejam disponíveis.

3.10 Material e Métodos: A descrição dos materiais e dos métodos usados deverá ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e a reprodução do trabalho. Processos e técnicas já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referenciados por citação.

3.11 Resultados: Deverão ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e, sempre que possível, ser acompanhados de tabelas e figuras adequadas. Os dados, quando pertinentes deverão ser submetidos a uma análise estatística.

3.12 Discussão: Deverá ser restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, evitando-se inferências não baseadas nos mesmos. Opcionalmente, Resultados e Discussão poderão ser apresentados num único item.

3.13 Agradecimentos: Este item é opcional e deverá vir antes das Referências Bibliográficas.

4. REFERÊNCIAS

A formatação das referências deve ser padronizada em conformidade com as exigências da revista, como é mostrado abaixo:

4.1 Referência dentro do texto:

- No início da citação: autor em caixa baixa, seguido do ano entre parênteses.

Ex. Pereira (1999).

- No final da citação: autor em caixa baixa e ano - ambos entre parênteses. Ex. (Silva, 1999) ou (Silva; Souza, 1998) ou (Silva; Souza; Dias, 2000) ou (Silva et al., 1999) ou (Silva et al., 1995a,b).

- Citação textual: colocar, também, a página . Ex. (Silva, 1999, p.24)

4.2 As Referências Bibliográficas serão ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, em caixa baixa e em ordem crescente de data de publicação. Deve-se levar em consideração as seguintes ocorrências:

4.2.1 Revista:

Será utilizado a abreviatura do periódico, em itálico, definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de um determinado periódico não puder ser localizado e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

- Vargas TOH 1996. Fatores climáticos responsáveis pela morte de borboletas na região sul do Brasil. *Rev Bras Assoc Entomol* 11: 100-105.

No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstracts, como segue:

- Qu W, Li J, Wang M 1991. *Chemical studies on Helicteres isora* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 22: 203-206, apud *Chemical Abstracts* 116: 124855r.

Numa citação de citação, colocar o nome das fontes em itálico.

- Wax ET 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. *J Braz Biol Res* 41: 77-82, apud *Nat Prod Abs* 23: 588-593, 1978.

4.2.2 Livro:

- Costa AF 1996. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

4.2.3 Capítulo de livro:

- Farias CRM, Ourinho EP 1999. Restauração dentária. In: Goldaman, G.T. (org.) *A nova odontologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.95-112.

4.2.4 Tese e Dissertação:

- Lima N 1991. *Influência da ação dos raios solares na germinação do nabo selvagem*. Campinas, 755p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Campinas.

- Romero MAV 1997. *Estudo químico de Brunfelsia hopeana Benth e do mecanismo de ação da escopoletina*. João Pessoa, 119p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Produtos naturais, Universidade Federal da Paraíba.

4.2.5 Congressos:

- Thomas G, Selak M, Henson PM 1996. Estudo da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* em neutrófilos humanos. *XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Florianópolis, Brasil.

4.2.6 Patentes:

Devem ser identificadas conforme modelo abaixo e na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado.

- Ichikawa M, Ogura M, Lijima T 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP* 61,118,396, apud *Chemical Abstracts* 105: 178423q.

4.2.7 Páginas Internet:

- <http://www.mobot.org>, acessada em maio de 2006.

5. CUSTOS

A Revista custeará integralmente os trabalhos de até 15 páginas, incluindo tabelas e figuras. Acima deste número de páginas, as despesas correrão por conta do(s) autor(es). Na versão impressa não serão publicados fotografias coloridas porque fica bastante dispendioso financeiramente, a não ser que o(s) autor(es) custeiem sua publicação, independente do número de páginas do trabalho. Entretanto, quando um trabalho contiver Figura(s) colorida(s) serão produzidos dois arquivos, um para impressão (Gráfica) em preto-e-branco e outro para Web, colorido, que ficará disponibilizado na Home Page do Scielo e no site da revista.

Envio de manuscritos

Os trabalhos deverão ser enviados, inicialmente, em três cópias impressas, utilizando-se o programa Word for Windows. Quando da aceitação do trabalho, após as devidas correções, deverão ser enviados um CD contendo o arquivo do trabalho e uma cópia impressa. Toda correspondência deverá ser enviada ao Editor-Chefe da Revista, conforme endereço abaixo:

Revista Brasileira de Farmacognosia

Prof. José Maria Barbosa Filho - Editor Chefe
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
Universidade Federal da Paraíba
Caixa Postal 5072
58051-970, João Pessoa - PB - Brasil

Na carta de encaminhamento é solicitado a indicação de cinco prováveis referees, de outras instituições, com seus endereços postais e eletrônicos. A qualificação do trabalho será atestada por, no mínimo, dois consultores, indicados pela Editoria.