



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALCIDES JAIRON LACERDA CINTRA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA LECTINA DE *Crataeva tapia* (CrataBL) LIVRE E
ENCAPSULADA

RECIFE
2017

ALCIDES JAIRON LACERDA CINTRA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA LECTINA DE *Crataeva tapia* (CrataBL) LIVRE E
ENCAPSULADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como cumprimento parcial das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia

RECIFE
2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Cintra, Alcides Jairon Lacerda
Avaliação da toxicidade da lectina de *Crataeva tapia* (CrataBL) livre e encapsulada. / Recife: O Autor, 2017.

70 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2017.

Inclui referências

- 1. Lectinas 2. Lipossomas 3. Toxicidade-testes I. Magalhães, Nereide Stela Santos (orient.) II. Correia, Maria Tereza dos Santos (coorient.) III. Título**

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 484

ALCIDES JAIRON LACERDA CINTRA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA LECTINA DE *Crataeva tapia* (CrataBL) LIVRE E
ENCAPSULADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como cumprimento parcial das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 14 de Fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Nereide Stela Santos Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira
Universidade Federal de Pernambuco

*À minha querida Mãe, por todo carinho
e amor,*

AGRADECIMENTOS

À minha Mãe, por todo esforço para que eu conseguisse meus objetivos e por todo amor a mim dedicado. E também a Ivoneide e Zizi, pelo amor e carinho, em todos os momentos da minha vida.

Agradeço a toda minha família, por todo apoio, carinho e atenção.

À minha Orientadora Prof.^a Dr.^a Nereide Stela dos Santos Magalhães, pela oportunidade e confiança, a mim concedidas, pelas orientações e direcionamentos, bem como pela disposição em sempre ajudar e colaborar com os trabalhos.

À minha Coorientadora Prof.^a Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia, pela colaboração nos trabalhos, na purificação da lectina, e também pelas orientações no desenvolvimento do projeto.

Às Prof.^{as} Dr.^{as} Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo, Laboratório de Rabiobiologia e Ana Christina Brasileiro Vidal, Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, pela colaboração nos experimentos.

À banca Prof.^{as} Dr.^{as} Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho e Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira, por terem aceitado avaliarem esta dissertação.

À Pós Doutoranda Rafaela Ferraz pela colaboração na formulação dos lipossomas, e pela sua educação e atenção.

A todos do LIKA e do laboratório de Glicoproteínas, professores, funcionários e alunos, pela infraestrutura e colaboração disponibilizada.

À minha noiva e mestrande, Marília do Nascimento Silva, pela compreensão, delicadeza, atenção e amor, em todos os momentos.

A todos os meus amigos, em especial ao Dr. Carlos Eduardo, aos Doutorandos Weber Melo e José Luís Ferreira Sá e ao Pós Doutor Janilson Félix, pelo apoio nas atividades e na vida.

A esta universidade, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, na pessoa do Coordenador, Prof. Dr. Ranilson e da Secretária, Sr.^a Adenilda, e a todos que dela fazem parte.

RESUMO

Moléculas com propriedades biológicas são extraídas de diversos organismos, a exemplo de plantas, como a *Crataeva tapia*, que pertence à família Caparidaceae, e da qual foi purificada uma lectina denominada CrataBL, com diversas propriedades, entre elas, antitumoral e anti-inflamatória. Mas apesar de suas propriedades promissoras, a aplicação dessa lectina encontra problemas como a degradação por fluidos biológicos e a rápida eliminação da corrente sanguínea. No propósito de obter uma nova formulação para superar esses problemas e de obter dados preliminares sobre a toxicidade da formulação e da lectina, a mesma foi encapsulada em lipossomas e foram avaliadas a toxicidade do nanossistema e da CrataBL frente a eritrócitos, além da avaliação da toxicidade da lectina em diferentes ensaios biológicos. A lectina foi purificada por cromatografia clássica de troca catiônica e os lipossomas preparados pelo método de congelamento/descongelamento. Os lipossomas exibiram tamanho médio de partícula de $168 \pm 0,56$ nm com uma distribuição de tamanho estreita e monodispersa ($PDI = 0,407$) e potencial zeta de $31,55 \pm 0,77$. A eficiência de encapsulação foi de $73 \pm 5,72$ %. No ensaio hemolítico a lectina, a fração e o extrato apresentaram os seguintes graus de hemólise (0,55; 0,68; 0,72 e 0,88 %), (1,38; 1,47; 1,67 e 1,87 %), (1,02; 1,08; 1,12 e 1,15 %), para as seguintes concentrações (50; 300; 600 e 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$). A lectina encapsulada apresentou (0,34; 0,91; 0,93; 1,25 e 5,37 %), para (62,5; 125; 250; 500 e 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$). A lectina apresentou atividade citotóxica e genotóxica significativa apenas em 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$, porém muito baixa em relação ao controle positivo, e não apresentou atividade mutagênica nas concentrações testadas. No ensaio embriotoxida a lectina apresentou mortalidade de 94% dos embriões, apenas em 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$. No cercaricida, a lectina em 300 e 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$, apresentou 100% das cercárias vivas e móveis, e em 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, menos de 50% das cercárias mortas, a fração e extrato apresentaram em 300 e 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$, toxicidade média: 50-90 % de cercárias mortas, e 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 90 % ou mais das cercárias mortas. Portanto, a CrataBL foi encapsulada com alta eficiência e tamanho de partícula de 168 nm, ideal para atividade antitumoral. A formulação lipossomal não apresentou atividade hemolítica, assim como a lectina livre, que também não apresentou ação mutagênica. Sendo esses dados importantes para futuras aplicações antitumorais *in vivo*. No ensaio com embriões e cercárias, a lectina apresentou toxicidade para os diferentes organismos apenas em 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Palavras Chave: *Crataeva tapia*. Lectina. CrataBL. Lipossoma. Toxicidade.

ABSTRACT

Molecules with biological properties are extracted from some organisms, an example of plants, such as a *Crataeva tapia*, which belongs to the family Caparidaceae, and the quality of a recipe called CrataBL, with several properties, including antitumor and anti-inflammatory. But despite its promising properties, the application of this lectin encounters problems such as degradation by biological fluids and rapid elimination of the bloodstream. The purpose of obtaining a novel formulation to overcome the problems and to obtain preliminary data on the toxicity of the formulation and the lectin, a fiction encapsulated in liposomes and evaluated forces, a nanosystem and CrataBL toxicity to erythrocytes, besides the evaluation of lectin toxicity in different biological assays. The lectin was completed by classical cation exchange chromatography and the liposomes prepared by the freeze / thaw method. Liposomes exhibited a 168 ± 0.56 nm portion average size with a narrow and monodispersed size distribution (PDI = 0.407) and zeta potential of 31.55 ± 0.77 . An encapsulation efficiency of $73 \pm 5.72\%$. (0.55, 0.68, 0.72 and 0.88%), (1.38, 1.47, 1.67 and 1.16, 1.67, 1.67, 1.67, 1, 87%), (1.02, 1.08, 1.12 and 1.15%) for the following concentrations (50, 300, 600 and 1000 $\mu\text{g} / \text{ml}$). An encapsulated lectin presented (0.34, 0.91, 0.93, 1.25 and 5.37%), to (62.5, 125, 250, 500 and 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$). The lectin presented significant cytotoxic and genotoxic activity only at 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$, but very low in relation to the positive control, and did not present the mutagenic activity at the tested concentrations. In the embryotoxid assay the lectin presented mortality of 94% of the embryos, only in 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Without cercaricide, a lectin at 300 and 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$ presented 100% of the live and mobile cercariae at 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, less than 50% of the dead cercariae, a fraction and extract showed at 300 and 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$, toxicity mean: 50-90% of dead cercariae, and 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 90% or more of the cercariae deaths. Thus, a CrataBL was encapsulated with high efficiency and part size of 168 nm, ideal for antitumor activity. A liposomal formulation showed no hemolytic activity, as well as a free lectin, and also did not present mutagenic action. These data are important for future in vivo antitumor applications. In the test with embryos and cercariae, one lectin showed toxicity to the different organisms only in 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Keywords: *Crataeva tapia*. Lectin. CrataBL. Liposome. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

- Figura 1:** Taxonomia da *Crataeva tapia*. A. Árvore, B. Detalhe do ramo com flor, folhas e começo da frutificação da planta e C. Detalhe do fruto aberto e fechado e das sementes. 15
- Figura 2:** Classificação estrutural de lectinas de plantas. 17
- Figura 3:** Estrutura primária da CrataBL. Sequência de aminoácidos da lectina. Os asteriscos indicam locais de glicosilação. 19
- Figura 4:** A. Estrutura tridimensional de um monômero de CrataBL. Três domínios que definem a dobra β -trevo são coloridos em azul, verde, e vermelho. N- e C-terminais e as alças reativas também são observados. Dois resíduos de hidratos de carbono são mostrados na forma de palitos. B. Dímero de CrataBL com suas duas moléculas, cor vermelha e azul, respectivamente. As alças reativas em ambos os monômeros são mostrados na cor cinza. Os elementos da estrutura secundária estão marcados na molécula como setas. 19
- Figura 5:** Purificação da lectina de *Crataeva tapia* por dois métodos diferentes (ênfatizando os diferentes rendimentos das isoformas). 20
- Figura 6:** Taxonomia da *Allium cepa*. A. Folha, bulbo e raiz; B. Sementes e C. Flor. 28
- Figura 7:** Estágios do desenvolvimento do embrião de *Biomphalaria glabrata*, observado através de um estereoscópio. (A) blástula, (B) gástrula, (C) trocófora jovem, (D) trocófora, (E) véliger jovem, (F) véliger, (G) hipostage e (H) animais eclodidos. 31
- Figura 8:** *Schistossoma mansoni* - cercária. 32

Artigo

Figura 1: Citotoxicidade da CrataBL (300, 600 e 1000 µg / mL) em células meristemáticas de raízes de A. cepa, através do índice mitótico (IM). C- (Controle negativo: Água destilada), C1+ (Controle positivo: MMS, metil metano-sulfonato), C2+ (Controle positivo: Trifluralina). * p<0,05. 42

Figura 2: Genotoxicidade da CrataBL (300, 600 e 1000 µg / mL) em células meristemáticas de raízes de A. cepa, através do índice de alterações cromossômicas (IAC). C- (Controle negativo: Água destilada), C1+ (Controle positivo: MMS, metil metano-sulfonato), C2+ (Controle positivo: Trifluralina). * p<0,05. 42

Figura 3: Mutagenicidade da CrataBL (300, 600 e 1000 µg / mL) em células meristemáticas de raízes de A. cepa, através do índice de mutagenicidade (IMt). C- (Controle negativo: Água destilada), C1+ (Controle positivo: MMS, metil metano-sulfonato), C2+ (Controle positivo: Trifluralina). ns p<0,05. 43

Figura 4: Avaliação da embriotoxicidade da glicoproteína CrataBL (25, 50, 100, 150, 200 e 500 µg / mL) por 24h. C1 (Controle Negativo, Água filtrada) e C2 (Controle Positivo, Niclosamida – NCL). * p<0,05. 45

Figura 5: Citotoxicidade eritrocitária da Lectina, fração e extrato (50; 300; 600 e 1000 µg / mL). Controle + (Triton 100) e Controle – (NaCl 0,15M). 49

Figura 6: Citotoxicidade eritrocitária da CrataBL encapsulada (62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg / mL). Controle + (Triton 100) e Controle – (NaCl 0,15 M). 50

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1: Trabalhos relacionados à lectina CrataBL.	22
--	-----------

Artigo

Tabela 1: Toxicidade da lectina, fração e extrato (μg / mL), frente a cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> .	46
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CrataBL - *Crataeva tapia* Bark Lectin

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

FAT - Freeze And Thaw

IPCS - Programa Internacional de Segurança Química

Lipo-CrataBL – Lipossoma CrataBL

MLV - Multilamellar Large Vesicles

RNA - Ácido Ribonucleico.

SUV - Small Unilamellar Vesicle

UNEP - United Nations Environment Programme

USEPA - United States Environmental Protection Agency

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 <i>Crataeva tapia</i> L.	14
2.1.1 Lectinas	15
2.1.2 CrataBL	18
2.2 Lipossomas	23
2.3 Ensaio Hemolítico	25
2.4 Ensaio Mutagênico	26
2.5 Bioensaio com embriões de <i>B. glabrata</i> e cercárias de <i>S. mansoni</i>	30
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA LECTINA DE <i>Crataeva tapia</i> (CrataBL) EM DIFERENTES ENSAIOS BIOLÓGICOS E ENCAPSULÇÃO EM LIPOSSOMAS	35
5 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

As plantas produzem uma grande variedade de biomoléculas, como lectinas, que exibem um amplo espectro de atividades biológicas, como: hipoglicemiante, antioxidante (BARRETO, 2016) e agente antimicrobiano (XIMENES, 2004). Entre essas plantas podemos citar a *Crataeva tapia* uma planta de uso medicinal pertencente à família Caparidaceae, que ocorre em Pernambuco, São Paulo, Minas Gerais (Zona da Mata), Mata Atlântica Pluvial e no Pantanal Mato-grossense (TABARELLI; SILVA, 2002). O extrato de sua casca é usado popularmente para o tratamento de diabetes, dor de estômago e febre (SHARON; LIS, 2001).

Em 2012, foi publicado o trabalho de purificação da lectina CrataBL, obtida a partir do extrato aquoso da entrecasca da *C. tapia*, uma lectina com carga predominantemente positiva ($pI > 10$), e que na forma nativa apresenta-se como um dímero. Além disso, essa proteína possui especificidade de ligação para glicose e galactose (ARAÚJO et al., 2012). Sua estrutura primária consiste de 164 ou 165 aminoácidos, presentes em duas isoformas distintas, e sua estrutura tridimensional revela domínios β -folha e dois sítios de ligação a carboidratos, em cada isoforma. Entre suas atividades estudadas, têm-se a avaliação de seu efeito antiproliferativo em linhagens de células cancerosas da próstata, com inibição do crescimento de 47% das células DU145 e 43% das células PC3 (FERREIRA et al., 2013), ação antitumoral, anti-inflamatória e analgésica (ARAÚJO et al., 2011).

Tendo em vista suas propriedades biológicas e do seu grande potencial como molécula biologicamente ativa, este trabalho lançou mão da utilização de um nanossistema carreador que pudesse promover eficiência na liberação controlada, diminuição na distribuição da molécula em tecidos ou órgãos não desejados, proteção contra fluidos biológicos e minimização da rápida eliminação da lectina (GUPTA; SHARMA, 2009). Para isso, foram utilizados lipossomas, que são vesículas que consistem de uma ou mais bicamadas de fosfolipídios concêntricos ao redor de um compartimento aquoso (TORCHILIN, 2005). E que já foram utilizados para a encapsulação de outras lectinas, como a Cramoll 1,4 (ANDRADE et al., 2004).

Nesse sentido, propomos a encapsulação da CrataBL em lipossomas convencionais com o intuito de fornecer uma nova formulação que possa potencializar as aplicações da lectina, através de maior biocompatibilidade e liberação eficiente. E ainda avaliar a toxicidade da lectina livre em diferentes ensaios biológicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Crataeva tapia* L.

Ao longo dos tempos os seres humanos têm contado com a natureza para satisfazer suas necessidades básicas, como alimentação e vestimenta, e ainda à utilização de substâncias como fontes de medicamentos para o tratamento de uma grande variedade de doenças (CRAGG; NEWMAN, 2013). No Brasil, a cultura indígena foi a responsável pela disseminação da medicina natural e até hoje, tanto em regiões mais carentes, quanto nos grandes centros urbanos, remédios à base de plantas medicinais são utilizados (MACIEL et al., 2002).

As plantas têm sido uma fonte de medicamentos para os seres humanos desde a pré-história e é notável que nas últimas quatro décadas, tem havido um ressurgimento do interesse no estudo e uso de plantas medicinais. Dessa forma, produtos naturais derivados de plantas foram caracterizados e identificados como novos compostos químicos de importância terapêutica (CORREIA et al., 2008). As plantas produzem uma grande variedade de biomoléculas e compostos químicos, como lectinas e metabólitos secundários, que exibem um amplo espectro de atividades biológicas, dentre elas: ação anticarcinogênica, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, hipolipidêmica e antimicrobiana (CAVALCANTE et al., 2011; PINTO et al., 2013). A planta *Crataeva tapia* L (figura 1) se enquadra nesse aspecto de fonte natural de produtos com propriedades biologicamente ativas, uma vez que, pode ser extraído lectinas dessa planta, por exemplo.

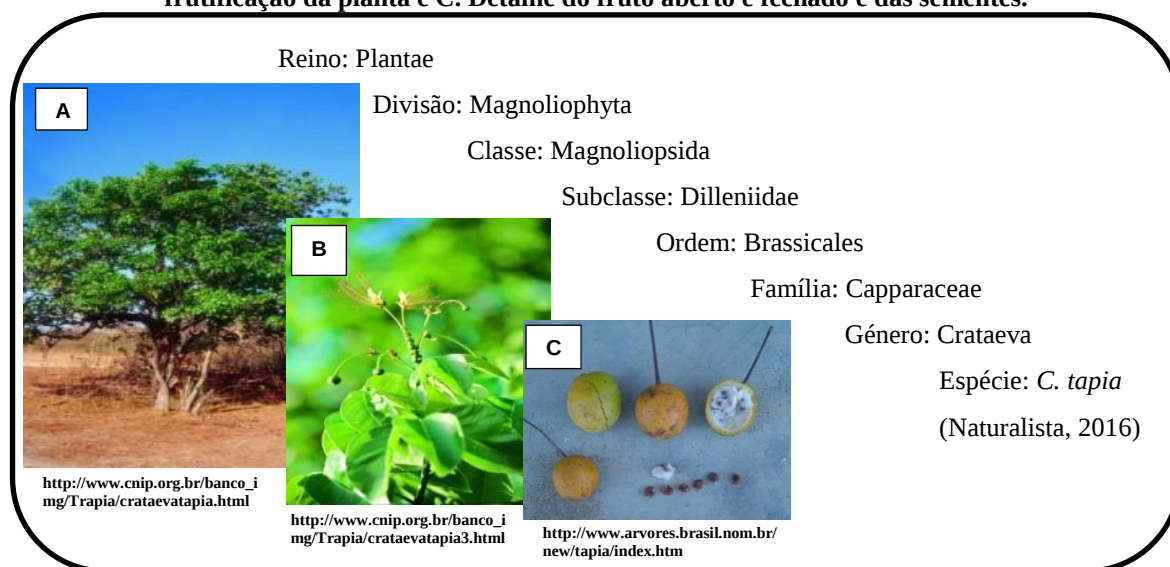
A *C. tapia* é uma pequena e muito ramificada árvore originária do sul da Índia, uma planta da família Caparidaceae, sendo chamada popularmente de cabaceira, cabeceira, cabaceira-do-pantanal e pau-d'alho, porém é mais conhecida como tapiá ou trapiá. Ocorre desde Pernambuco até São Paulo e Minas Gerais (Zona da Mata), na Mata Atlântica Pluvial e no Pantanal Mato-grossense. Em Pernambuco foi encontrada no litoral, na zona da mata e em vegetação de caatinga (TABARELLI; SILVA 2002). Sua madeira tem sido empregada na construção civil, em forros, caixotaria e confecção de canoas (LORENZI, 2002 apud PRATISSOLI, et al., 2007).

A *C. tapia* é também utilizada como remédio caseiro na região Nordeste do semi-árido brasileiro (LUCENA et al., 2007). O extrato de sua casca é usado popularmente para o

tratamento de diabetes, dor de estômago e febre. Os estudos farmacológicos com a casca da raiz e casca do caule de *C. tapia*, têm confirmado os seus efeitos benéficos no apoio à gestão dos distúrbios urinários, incluindo urolitíase, e revelou seus potenciais benefícios na diminuição de processo inflamatório, tal como a artrite (SHARON; LIS, 2001). Além disso, é usada como antidisentérico e o fruto no combate às infecções do trato respiratório (LORENZI, 2002).

A espécie *C. tapia*, apresenta odor de alho em suas folhas, mede de 5-12 m de altura, dotada de uma copa arredondada e densa, sendo recomendada para a arborização e recomposição de áreas degradadas. Os frutos são comestíveis, muito apreciados pela fauna e ingeridos pelos humanos apenas como refresco e bebida vinosa. Suas sementes são oleaginosas, de cor marrom clara, medindo cerca de 1 cm e as flores são apícolas (LORENZI, 1998; LORENZI, 2002).

Figura 1: Taxonomia da *Crataeva tapia*. A. Árvore, B. Detalhe do ramo com flor, folhas e começo da frutificação da planta e C. Detalhe do fruto aberto e fechado e das sementes.



Fonte: Autor Próprio

2.1.1 Lectinas

As pesquisas com lectinas começaram com STILMARK em 1888, que detectou proteínas tóxicas retiradas da mamona (*Ricinus communis* L.) capazes de aglutinar eritrócitos (SHARON; LIS, 1972). Em 1919, com a melhoria das técnicas de isolamento de proteínas, SUMNER purificou a primeira lectina a partir de sementes de *Canavalia ensiformis*, que foi denominada concanavalina (ConA) (SUMNER, 1919).

Atualmente, com sua melhor caracterização e definição, sabe-se que tais proteínas são responsáveis por decifrar glicocódigos, por meio de interações de superfície complexa e desempenham um papel central em um número considerável de funções e atividades biológicas (MURPHY, 2013).

O termo “lectina” (do latim *lectus*, significa selecionado, escolhido) foi proposto para designar um grupo de proteínas que apresentava a característica comum de seletividade na interação com carboidratos (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). O termo aglutinina é usado como sinônimo para lectina, em referência à habilidade de aglutinar eritrócitos ou outras células.

Mais recentemente as lectinas têm sido descritas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune (FRANCIS et al., 2011; VAN DAMMES et al., 2011) que podem reconhecer e se ligar reversivelmente a hidratos de carbono ou outras substâncias derivadas de carboidratos (CORREIA et al., 2008). E muitas delas, são altamente estáveis termicamente, e relativamente resistentes a enzimas digestivas e ácidos (KUMAR et al., 2012).

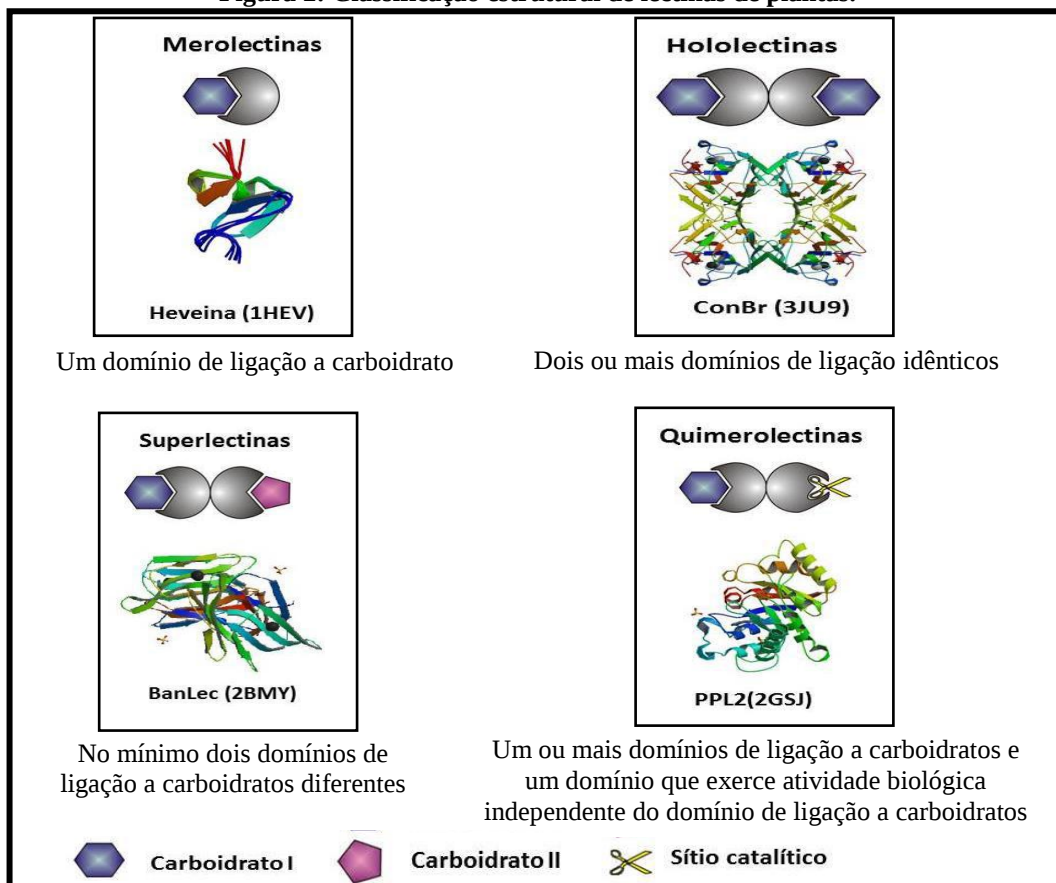
As lectinas são encontradas nos mais variados microorganismos, desde vírus e bactérias até plantas e animais, sendo que as lectinas provenientes de plantas são as mais comumente caracterizadas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; PESQUERO et al., 2008). A interação entre lectinas e carboidratos pode ser tão específica quanto a interação entre antígeno e anticorpo ou substrato e enzima (MINKO, 2004). Devido a sua interação com carboidratos, em certos casos com essa alta especificidade, as lectinas têm sido ferramentas moleculares versáteis e úteis para o estudo de glicoconjugados sobre a superfície das células. Sendo assim, excelentes candidatos a serem exploradas na pesquisa do câncer e como agentes terapêuticos (NEUMANN et al., 2004; BITENCOURT et al., 2008).

De modo geral as lectinas podem ser classificadas de acordo com o monossacarídeo para o qual elas apresentam maior afinidade, podendo agrupá-las em cinco grupos: ligantes a: manose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, fucose e ácido N-acetilneuramínico (AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005).

As lectinas de plantas podem ser divididas em quatro grupos principais (figura 2), merolectinas, hololectinas, superlectinas e quimerolectinas. As merolectinas apresentam um sítio de ligação a carboidrato, as hololectinas dois ou mais sítos de ligação idênticos, as superlectinas pelo menos dois sítios de ligação distintos e as quimerolectinas no mínimo um sítio de ligação a carboidrato e outro sítio que tem a atividade biológica independente (VAN

DAMME et al., 1998; VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011). As lectinas clássicas contêm dois ou mais sítios de ligação a carboidratos e, portanto, a sua interação com os açúcares presentes na superfície de eritrócitos resulta na reticulação de várias células do sangue e subsequente precipitação (AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005).

Figura 2: Classificação estrutural de lectinas de plantas.



Fonte: Adaptado de VAN DAMME et al., 1998 apud VASCONCELOS, 2013.

A lectinas apresentam muitos estudos e aplicações, como agente antimicrobiano (XIMENES, 2004), agente antihiperglicêmico e antioxidante (BARRETO, 2016) marcadores tumorais (BELTRÃO et al., 1998), detecção de alterações durante transformações celulares (KABIR, 1998), avaliação de superfícies celulares, estimulação mitogênica (NOMURA et al., 1998) e marcação sanguínea (MO et al., 2000). Também na área da tipagem celular e de diagnóstico, com a identificação de células leucêmicas por citometria de fluxo, utilizando lectinas conjugadas (FERREIRA, 2010), no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para glicoproteínas de interesse clínico, a partir de filmes mistos de fosfolipídios e lectinas depositados em substratos sólidos (LUNA, 2015). Em imagem molecular, utilizando lectinas fluorescentes, permitindo a identificação endoscópica rápida de displasia de Barrett no esôfago (BIRD-LIEBERMAN et al., 2012).

Ainda ressaltando as aplicações, agora com as respectivas macromoléculas, têm-se a utilização da lectina Cramoll 1,4 como agente promissor no desenvolvimento de uma nova formulação para o tratamento das leishmanioses visceral e tegumentar (SILVA, 2014), a lectina DLasiL (*Dioclea lasiocarpa*) como agente antitumoral em células de carcinoma de ovário humano (A2780) (GONDIM, 2014), bem como da lectina isolada da esponja marinha *Haliclona caerulea* (H3) sobre células do adenocarcinoma de mama humano (MCF7) (NASCIMENTO 2016) e da lectina purificada da esponja marinha *Cinachyrella apion* (CaL) em linhagem tumoral HeLa (RABELO 2011). A lectina de Mistletoe e arabinosilano, usadas na melhoria da qualidade de vida de pacientes com tumor, após o tratamento com um imunomodulador padronizado, composto por elas (HAJTO; HORVÁTH; PAPP, 2016). A Concanavalina A, entre outros tipos de lectinas de plantas, como agente capaz de mimetizar o efeito da insulina em muitos tipos de células através da interação direta com resíduos de glicoproteínas nos receptores da insulina (CUATRECASAS; TELL, 1973 apud PURRELO et al., 1983).

Como já citado, algumas lectinas podem ser mitogênicas, são capazes de ativar linfócitos, sendo conhecidas como mitógenos indutores de proliferação. *In vitro*, a fitohemaglutinina (PHA) e a ConA são mitogênicas para linfócitos T, e o caruru de cacho (pokeweed mitogen - PWM) estimula tanto células T, como células B, levando à produção de citocinas e receptores para citocinas, que juntos direcionam os clones selecionados durante a proliferação até a maturação de células efectoras e de memória, participando assim da resposta imune (ROITT et al., 1997).

O evento primário em muitos processos biológicos como a infecção, diferenciação celular, simbiose de bactérias, formação de órgãos e metástase, é a associação lectina-carboidrato (SHARON, 1993), por isso, entre outros fatores, as lectinas são tão estudadas.

2.1.2 CrataBL

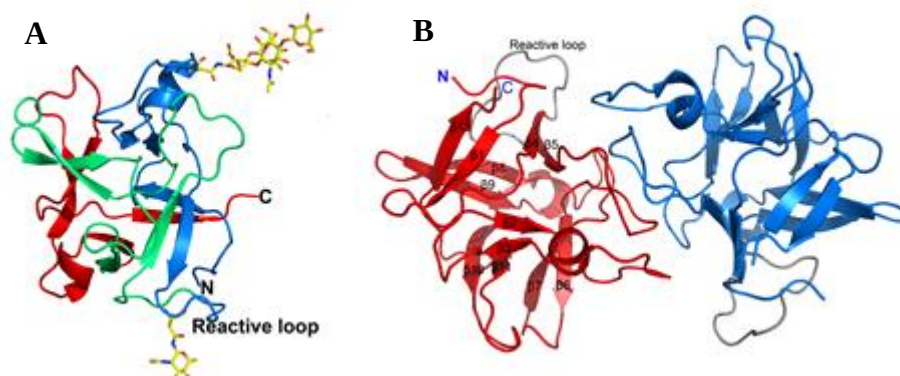
A CrataBL (Crataeva tapia Bark Lectin) é uma lectina com carga predominantemente positiva (pI>10) e peso molecular de 40 kDa na forma nativa (dimérica), purificada a partir do extrato aquoso da casca da *C. tapia*. Além disso, essa proteína possui especificidade de ligação para glicose e galactose (ARAÚJO et al., 2012). A estrutura primária da CrataBL (figura 3) consiste em um polipéptido de 164 ou 165 aminoácidos de comprimento, presente em pelo menos duas isoformas distintas, que diferem nas posições 31 (Pro/Leu); 92 (Ser/Leu); 93 (Ile/Thr); 95 (Arg/Gly) e 97 (Leu/Ser) (FERREIRA et al, 2013).

Figura 3: Estrutura primária da CrataBL. Sequência de aminoácidos da lectina. Os asteriscos indicam locais de glicosilação.

10	20	* 30
AILTGVPYYI	LPSTSRAGFS	PDNLRK*NTSQ
40	50	* 60
PSCPLDLITQ	LRFPRRIGVP	VIFTPQ*NSSL
70	80	90
KVVPLSHNLN	IHTCSDLWFC	PESKIWTVKS
100	110	120
SSIHRGLVVT	TGGTFRSLGS	WFRIERHGDS
130	140	150
YKLVHCPRGS	TPCRDVGIET	VGGGGRRYLA
160		
PRDRPLAVRF	TRAS	

Fonte: ZHANG et al., 2013.

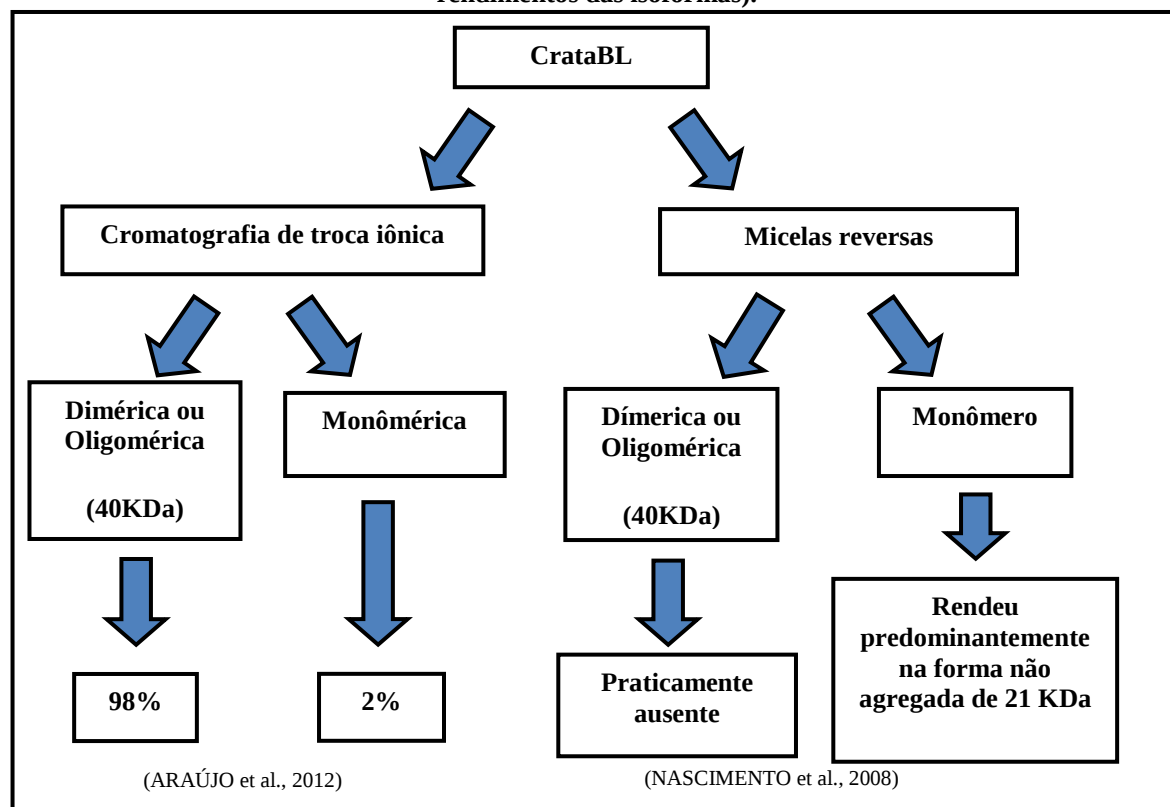
Figura 4: A. Estrutura tridimensional de um monômero de CrataBL. Três domínios que definem a dobra β -trevo são coloridos em azul, verde, e vermelho. N- e C-terminais e as alças reativas também são observados. Dois resíduos de hidratos de carbono são mostrados na forma de palitos. B. Dímero de CrataBL com suas duas moléculas, cor vermelha e azul, respectivamente. As alças reativas em ambos os monômeros são mostrados na cor cinza. Os elementos da estrutura secundária estão marcados na molécula como setas.



Fonte: FERREIRA et al., 2013.

Essa lectina poder ser obtida predominante na forma monomérica ou dimérica (figura 4), dependendo do método de purificação utilizado (figura 5). A extração da CrataBL por micelas reversas, utilizando AOT em isooctano, forneceu ela principalmente na forma monomérica (NASCIMENTO et al., 2008), já a purificação por cromatografia de troca iônica, obteve-se principalmente na forma dimérica (ARAÚJO et al., 2012).

Figura 5: Purificação da lectina de *Crataeva tapia* por dois métodos diferentes (ênfatisando os diferentes rendimentos das isoformas).



Fonte: Autor Próprio.

Existem diversos trabalhos realizados (tabela 1) e publicados em periódicos, que podem elucidar melhor as características e propriedades dessa lectina. Além dos já citados, têm-se também:

A avaliação de seu efeito antiproliferativo em linhagens de células cancerosas de próstata, apresentou inibição do crescimento de 47% das células DU145 e 43% das células PC3. E também foi verificado que a CrataBL apresenta uma grande semelhança com inibidores de protease do tipo Kunitz (FERREIRA et al, 2013).

O tratamento de camundongos com CrataBL (20 mg / kg), reduziu o volume do Sarcoma 180, em torno de 47 %. A lectina também promoveu redução significativa, 35,4 %, no número de PMNL (leucócitos polimorfonucleares) no exsudato inflamatório. E verificou-se que a CrataBL causou inibição significativa na resposta nociceptiva, cerca de 65 % (ARAÚJO et al., 2011).

Animais no grupo tratado com CrataBL (1,25, 5,0 e 10 mg / kg) antes da indução do trombo, apresentaram tempo de oclusão da artéria total (60,86 ±12,76; 75,27 ±19,37; 75,80 ±23,38 min, respectivamente) em comparação ao controle (NaCl 0,15M) (45,63 ± 9,54 min).

Os animais tratados apenas com heparina (50 U) ($59,84 \pm 8,93$ min), não apresentaram diferença significativa no tempo de oclusão em relação ao controle, enquanto animais tratados com Fondaparinux[®] (anticoagulante indicado na prevenção de eventos tromboembólicos venosos) (0,7 mg / kg) e animais tratados com CrataBL (10 mg / kg) + heparina prolongou o tempo de oclusão total ($76,42 \pm 21,74$ min e $79,74 \pm 15,16$, respectivamente) em comparação ao controle ($45,63 \pm 9,54$ min). Estes resultados mostram que a CrataBL preveniu trombose nesses animais e interage com heparina, mostrando-se eficaz no bloqueio da coagulação e formação de trombo arterial, sem ter a desvantagem do aumento do tempo de sangramento. Isso a torna promissora para pacientes com diabetes e câncer (SALU et al., 2014). Análise posterior, confirmou que CrataBL possui elevada afinidade com heparina (ZHANG et al 2013).

A administração intraperitoneal de CrataBL (10 mg / Kg / dia e 20 mg / Kg / dia) durante 10 dias em camundongos diabéticos induzidos por aloxano (composto orgânico que provoca diabetes mellitus insulino dependente) promoveu uma redução significativa dos níveis séricos de glicose (14,9% e 55,9%, respectivamente). A ureia sérica, creatinina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase também foram significativamente reduzidas após o tratamento com ambas as doses de CrataBL. Além disso, a análise histológica de fígado, rim e pâncreas revelou uma melhoria na morfologia do tecido após o tratamento com CrataBL. Os resultados sugerem que a CrataBL tem uma atividade hipoglicêmica benéfica e melhora as complicações hepáticas e renais da diabetes (ROCHA et al., 2013).

O tratamento com CrataBL, foi capaz de diminuir a constrição de vias aéreas e parênquima pulmonar. Ela causou uma redução significativa de óxido nítrico exalado e levou a um controle da resposta inflamatória, com diminuição do lavado broncoalveolar, do número de neutrófilos, de linfócitos, de eosinófilos e do diâmetro alveolar médio. A CrataBL, também foi capaz de diminuir o número de neutrófilos e TNF- α no parênquima e nas vias aéreas pulmonares e de macrófagos só no parênquima pulmonar. Também houve controle do remodelamento pulmonar, pois a CrataBL teve como ação, a diminuição de fibras colágenas e fibras elásticas, MMP-9, MMP-12, TIMP-1 no parênquima pulmonar e nas vias aéreas. Além disso, observou-se uma diminuição da MUC-5 nas vias aéreas e atenuação da resposta de estresse oxidativo com redução da expressão de iNOS, eNOS e isoprostano, tanto em vias aéreas quanto no parênquima pulmonar (OLIVA et al., 2011).

Tabela 1: Trabalhos relacionados à lectina CrataBL.

TRABALHOS	REFERÊNCIAS
A lectina inibidora do Fator Xa, CrataBL, interfere na coagulação sanguínea e compromete formação de trombos.	(SALU et al., 2014)
Efeito da lectina da <i>Crataeva Tapia</i> , inibidora de protease, em um modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica.	(RODRIGUES et al., 2015)
Efeito da lectina inibidora de protease, CrataBL, em alterações mecânicas, inflamatórias e remodelamento pulmonar distal induzidas por elastase em camundongos.	(OLIVA et al., 2011)
Estrutura cristalina da proteína de <i>Crataeva tapia</i> (CrataBL) e seu efeito em linhagem de células cancerosas da próstata.	(FERREIRA et al, 2013)
Estudo estrutural da interação da proteína de <i>Crataeva tapia</i> com heparina e outros glicosaminoglicanos.	(ZHANG et al., 2013)
Extração da lectina de <i>Crataeva Tapia</i> por micelas reversas utilizando AOT em isooctano.	(NASCIMENTO et al., 2008)
Lectina da <i>Crataeva tapia</i> é um adsorvente de afinidade e agente inseticida.	(ARAÚJO et al., 2012).
Lectina da <i>Crataeva tapia</i> melhora danos no tecido e hiperglicemia em plasma, em camundongos diabéticos induzidos por Alloxan.	(ROCHA et al., 2013).
Lectina de <i>Crataeva tapia</i> exerce atividade antitumoral, anti-inflamatória e analgésica.	(ARAÚJO et al., 2011).
Lectina inibidora de protease, CrataBL, atenua a inflamação, remodelação da matriz extracelular e alterações mecânicas pulmonares induzidas por elastase, em camundongos.	(OLIVA et al., 2015)
Potencial da lectina/inibidor isolada de <i>Crataeva Tapia</i> (CrataBL) para controlar o desenvolvimento da larva do <i>Callosobruchus maculatus</i> .	(NUNES et al., 2015)

Fonte: Autor Próprio

2.2 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (FRÉZARD et al., 2005). Sendo possível encapsular uma grande variedade de moléculas dentro desses espaços (FRÉZARD, 1999), como fármacos, biomoléculas e agentes de diagnóstico (TORCHILIN, 2005).

Os primeiros lipossomas desenvolvidos eram formados de fosfolipídios e colesterol, denominados convencionais, alguns eram formulados também com lipídeos positivos ou negativos, promovendo maior estabilidade, pois agregação e fusão das vesículas são exemplos dos principais processos que promovem instabilidade, então a adição de lipídeos com carga (p.ex., estearilamina ou dicetilfosfato) produz repulsão de cargas entre as vesículas, minimizando a agregação e fusão (BATISTA et al., 2007). Esses nanossistemas têm sido estudados como veículos para entrega de fármacos, frente a agentes microbianos e parasitários e para combater infecções no MPS (sistema mononuclear fagocítico) (AGRAWAL; GUPTA 2000; BASU; LALA 2004). Os carreadores lipossomais podem também vetorizar moléculas como DNA e RNA, que são negativas, sendo necessário para isso a formulação de lipossomas catiônicos (BATISTA et al., 2007).

Os lipossomas podem ser classificados pelo número de bicamadas presentes na vesícula, pelo método de preparação, ou pelo seu tamanho. Quando os lipossomas são descritos com base no número de bicamadas, são chamados de vesículas unilamelares (ULV, unilamellar vesicles, 0,025-0,1 μm) ou vesículas multilamelares (MLV, multilamellar vesicles, 0,05-10 μm); quando baseadas no método de preparação, são chamados de vesículas formada por evaporação de fase reversa (REV, reversephase evaporation vesicles, 0,5 μm), vesícula formada em prensa de French (FPV, French press vesicle, 0,05 μm) ou vesículas formadas por injeção de éter (EIV, ether injection vesicles, 0,02 μm), e quando descritos com base no seu tamanho, são chamados de vesículas unilamelares grandes (LUV, large unilamellar vesicles, 0,1 μm) ou vesículas unilamelares pequenas (SUV, small unilamellar vesicles, 0,025-0,05 μm) (VEMURI; RHODES, 1995).

A tecnologia tem crescido muito na área do desenvolvimento de novos fármacos e isso tem permitido um grande número de novos tratamentos baseados em moléculas complexas, como proteínas. Porém, o sucesso da aplicabilidade dessas moléculas irá depender da

eficiência do sistema escolhido para seu direcionamento no organismo, pois o sistema de liberação está estritamente ligado à proteção e interiorização celular da molécula (ABU-DAHAB et al., 2001).

A eficiência e destinação de moléculas biologicamente ativas, como proteínas terapêuticas, é o caminho para viabilizar o seu uso comercial. Apesar do desenvolvimento e evolução dos sistemas de entrega de proteínas, persistem ainda alguns problemas, como a rápida eliminação e a distribuição do fármaco em tecidos ou órgãos não desejados, o que aumenta a necessidade de doses frequentes (CLELAND; DAUGHERT, 2001). Os lipossomas tem se tornado uma alternativa viável para superá-los (TORCHILIN, 2011). Esse nanossistema tem chamado atenção para entrega de moléculas complexas como proteínas, fornecendo com o encapsulamento, biocompatibilidade e proteção frente a fluidos biológicos, evitando possível desestabilização da macromolécula (GUPTA; SHARMA, 2009). Isso é primordial em uma época na qual se buscam novas alternativas para o tratamento e cura de diversas doenças. E ao mesmo tempo, novas moléculas, como proteínas e peptídeos, com potencial terapêutico têm sido descobertas por processos biotecnológicos e referendados pelos mais importantes institutos reguladores internacionais, para utilização em tratamentos (CLELAND; DAUGHERT, 2001).

Pesquisas envolvendo lectinas e lipossomas têm-se mostrado promissoras. Lipossomas (sítio-específicos/imunolipossomas) revestidos com a lectina *Canavalia ensiformes* (ConA), carregados com DOX (doxorubicina, fármaco amplamente utilizado na quimioterapia do câncer), inibiu 50% a mais, a proliferação de células HEp-2, em contraste com DOX livre (ROLIM-SANTOS et al, 2006). A aglutinina do germe de trigo (WGA), a lectina do tomate (TL) e a aglutinina *Ulex europaeus* 1 (UEA-1) revestindo lipossomas (sítio-específicos), contendo insulina, aumentaram a biodisponibilidade em 21,40, 16,71 e 8,38% (WGA, TL e UEA-1, respectivamente), em camundongos diabéticos, quando comparados a formulação não modificada com as lectinas. (ZHANG et al., 2005). A encapsulação de antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) em lipossomas (sítio-específicos) revestidos com a lectina UEA-1, foram desenvolvidos para aumentar a captação transmucosa por células-M da placa de Peyer, mostrando que esses lipossomas poderiam ser promissores para o desenvolvimento de vacinas para esse tecido (GUPTA; VYAS, 2011). Lipossomas (sítio-específicos) revestidos com lectina foram avaliados para a adesão e internalização por células do epitélio alveolar humano, e os resultados confirmaram a ligação e captação dos lipossomas revestidos com a lectina, o que não ocorreu com os lipossomas não modificados, proporcionando uma

tecnologia útil para melhor entrega de macromoléculas hidrofílicas (como anticorpos) nos alvéolos pulmonares (BRÜCK et al., 2001), também foi realizada a nebulização desses lipossomas (com um nível maior de colesterol, para melhor estabilidade da formulação) frente a esse tipo celular (células do epitélio alveolar humano), e foi verificado novamente a ligação e captação pelas células, e revelando também uma nova alternativa para aplicação de lipossomas (ABU-DAHAB; SCHÄFER; LEHR, 2001). Lipossomas (MLV's) revestidos com um conjugado de carbopol (polímero hidrossolúvel) - lectina (WGA) foram capazes de aumentar o efeito farmacológico da calcitonina (hormônio peptídico) administrada oralmente. Por exemplo, no tempo de 24h (após administração) houve uma diminuição de cerca de 15% do nível de cálcio no sangue, comparado com os lipossomas revestidos apenas com carbopol (WERLE; MAKHLOF; TAKEUCHI, 2010). Além disso, a eficácia farmacológica da calcitonina encapsulada em lipossomas revestidos com carbopol e lectina-carbopol, foi aumentada em mais de 3 e 20 vezes, respectivamente, após a administração peroral, comparados com os lipossomas não modificados (MAKHLOF, 2011). O revestimento de lipossomas (sítio-específicos) com lectinas também são relevantes, porque macrófagos possuem receptores glicoprotéicos, que reconhecem e endocitam esses nanossistemas, o que é importante para combater doenças inflamatórias, por exemplo (KELLY; JEFFERIES; CRYAN, 2011). Além desses estudos, a encapsulação da enzima ativadora de plasminogênio tecidual em lipossomas convencionais e peguillados, aumentou em 16 e 21 vezes, respectivamente, o seu tempo de meia vida (KIM et al., 2009).

2.3 Ensaio Hemolítico

O efeito da maioria das drogas sobre o organismo resulta de suas interações com macromoléculas, muitas das quais são componentes da membrana plasmática. A capacidade de um composto químico interagir com as membranas biológicas é determinante para sua absorção, distribuição, biotransformação e excreção, bem como para o estabelecimento de sua atividade. As membranas eritrocitárias são muito úteis no estudo da interação de fármacos, cosméticos e outras substâncias com ação sobre sistemas biológicos. (BENET; KROETZ; SHEINER, 1996; MALHEIROS et al., 2000; PRETÉ et al., 2011).

Os eritrócitos, também conhecidos como hemácias ou glóbulos vermelhos, são células anucleadas com forma discoide bicôncava que contém hemoglobina em concentração elevada, cerca de 5 mM / célula. Para cumprir a função de transportar a hemoglobina e levar oxigênio a todas as células, o eritrócito percorre todos os vasos sanguíneos do organismo

aproximadamente 500.000 vezes, durante sua vida média de 120 dias (BULL; BRETON-GORIUS; BEUTLER, 1990).

A membrana do eritrócito, devido à sua facilidade de obtenção e isolamento tem sido extensivamente estudada e suas características principais são bastante conhecidas, sendo, portanto um ótimo modelo para o estudo de membranas mais complexas, e de outros tipos de células. A proporção, em peso, de proteínas: lipídios: carboidratos é 49: 43: 8 nessas membranas (MONTGOMERY, 1994).

A principal classe de lipídios da membrana eritrocitária, bem como na maior parte das membranas biológicas, é a dos fosfolípidios. A composição lipídica da membrana eritrocitária é constituída de fosfolípidios (47,5%), colesterol (25%), esfingomielina (17,5%) e glicolipídios (10%). Os fosfolípidios estão distribuídos assimetricamente entre as monocamadas interna e externa da membrana eritrocitária (STORCH; KLEINFELD, 1985).

O monitoramento da integridade dos eritrócitos pode ser feito com relativa facilidade, detectando-se fotometricamente a hemoglobina liberada em solução ou, potenciometricamente, o potássio liberado no meio extracelular, sugerindo que a lise ocorra em função da formação de pequenos poros na membrana. Testes hemolíticos permitem avaliar quantitativamente o rompimento das células vermelhas, causado pela interação de componentes químicos com membranas, em que a hidrofobicidade e a presença de grupos ionizáveis são fatores determinantes. O teste hemolítico é atualmente considerado um importante método na avaliação de toxicidade de novos compostos (MALHEIROS et al., 2000).

2.4 Ensaio Mutagênico

Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o DNA, alterando a sua estrutura ou função. Quando essas alterações se fixam e adquirem a capacidade de serem transmitidas, passam a ser denominadas de mutações (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2003). As mutações são a origem de toda a variabilidade genética, sendo fundamentais para a manutenção das espécies. Por isso, se diz que sem a mutação, a vida seria inimaginável, apesar do potencial danoso que ela possui (ERDTMANN, 2003).

As mutações podem ocorrer tanto em células somáticas como em células germinativas. Porém, apenas as mutações em células germinativas podem ser perpetuadas entre as gerações,

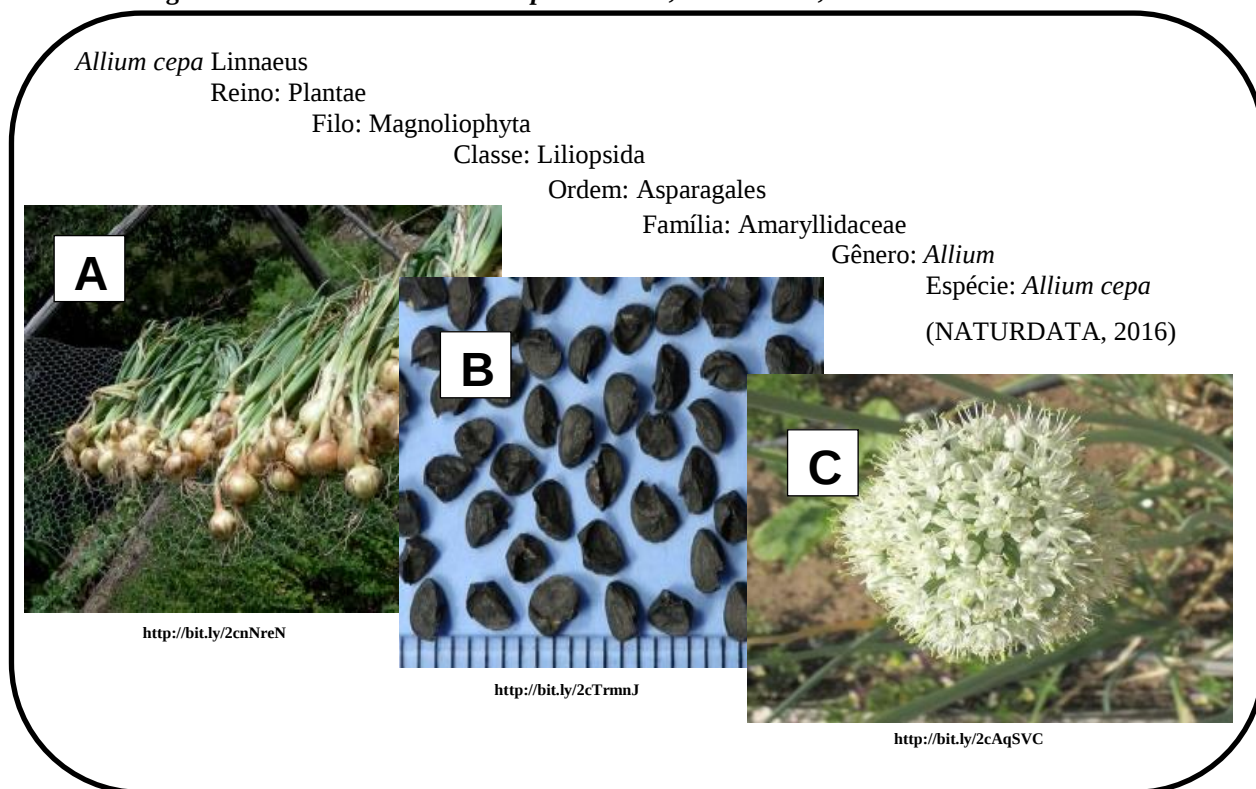
sendo essas mutações as responsáveis pelas doenças hereditárias. (GRIFFITHS et al., 2001; NUSSBAUM et al., 2006). As mutações são convencionalmente classificadas em gênicas (ou pontuais) e cromossômicas. As mutações gênicas referem-se às mudanças de um ou poucos nucleotídeos do polímero de DNA, por deleções, duplicações e/ou alterações de pares de bases, que acabam modificando, portanto, o funcionamento de um gene. Já nas mutações cromossômicas, há uma reorganização na estrutura do DNA por translocação, inversão, deleção, duplicação, fusão e fissão dos cromossomos, alterando o complemento cromossômico em estrutura e/ou número (ERDTMANN, 2003; JUNDI; FREITAS, 2003).

A mutagênese é a ciência que estuda o processo de indução de danos no DNA pela ação de agentes químicos, físicos e biológicos, podendo resultar em mudanças hereditárias ao organismo (ZEIGER, 2007; SCCNFP, 2003). Modificações na estrutura do DNA são prejudiciais às células, uma vez que podem prejudicar processos vitais, tais como a duplicação do DNA e a transcrição gênica. Elas também podem causar mutações e aberrações cromossômicas, fenômenos estes que podem levar ao desenvolvimento de processos cancerosos e morte celular. (DA COSTA; MENK, 2000).

Análises de genotoxicidade são executadas em bioindicadores de toxicidade, ou de efeitos adversos, que podem ser definidos como: “qualquer resposta biológica, ao nível do indivíduo ou a um nível inferior, a um ambiente químico, que traduz a exposição a esse ambiente”; alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais incluem-se nesta (WHO, 1993; CAPELA, 2001). Os impactos causados por agentes tóxicos no ambiente e saúde humana, muitas vezes, não podem ser observados e medidos diretamente e, portanto, devem ser analisados através de metodologias de detecção eficientes (SILVA; FONSECA, 2003).

O *Allium cepa* L. (figura 6) é um vegetal eficiente na detecção de toxicidade genética, uma planta bulbosa com hastes eretas, côncavas e dilatadas na base, com folhas verdes, compridas e fistulosas. As flores são esbranquiçadas, esverdeadas ou róseas, agrupadas em umbelas arredondadas dispostas na extremidade da haste, apresentando de duas a quatro brácteas curtas. O fruto é uma cápsula pequena (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Figura 6: Taxonomia da *Allium cepa*. A. Folha, bulbo e raiz; B. Sementes e C. Flor.



Fonte: Autor Próprio

Os bioensaios com plantas são considerados bastantes sensíveis e simples e têm sido validados por instituições internacionais, como o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP - United Nations Environment Programme), Organização Mundial de Saúde (WHO - World Health Organization) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA - United States Environmental Protection Agency), pela sua eficiência no monitoramento dos efeitos genotóxicos e mutagênicos (GRANT 1982).

O teste em *A. cepa* é um método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes, ele é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS - International Programme on Chemical Safety) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP). Esse método é tido como eficiente para análise e monitoramento de genotoxicidade *in situ* de amostras ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

Dentre as plantas superiores, a *A. cepa* (cebola) tem sido indicada como um importante organismo-teste de mutagenicidade (FERNANDES et al., 2007). Este sistema tem sido amplamente utilizado na avaliação do potencial citotóxico de efluentes, e considerado eficiente na detecção de alterações no índice de divisão celular e presença de aberrações cromossômicas em resposta a estes agentes. A eficiência do teste em *A. cepa* se deve as suas

características cinéticas de proliferação, ao rápido crescimento de suas raízes, ao grande número de células em divisão, a sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, a sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008).

Além disso, sistemas testes vegetais como o *A. cepa*, têm sido utilizado para avaliar os efeitos de genotoxicidade de extratos e substâncias puras de vegetais (FACHINETTO et al., 2007; ROLIM, 2007; SISENANDO, 2009). Ele também é funcional no estudo mutagênico de uma grande variedade de compostos químicos e monitoramento de poluição ambiental (MA et al., 1995).

O sistema teste em estudo permite a avaliação de concentrações diferentes, porque as raízes ficam em contato direto com os diferentes tratamentos da substância testada, isso torna esse teste muito aceito para avaliar a citotoxicidade das mais diversas substâncias. Auxiliando também no alerta da população sobre o consumo de um produto, pois nele podem ser observadas alterações da divisão das células meristemáticas da raiz da cebola e alterações cromossômicas, quando expostas a um agente agressor (VICENTINI et al., 2001).

Vegetais superiores constituem um importante material para testes genéticos usados para monitoramento de poluentes, sendo, atualmente, reconhecidos como bons indicadores de efeitos citogenéticos e mutagênicos de substâncias químicas ambientais (YI; MENG, 2003). Os sistemas-teste de plantas podem detectar a genotoxicidade mais rápida e eficientemente do que ensaios com animais, além de ser mais simples e econômicos, podem ser utilizados com sucesso em biomonitoramento ambiental (YI; MENG, 2003; BEZRUKOV; LAZARENKO, 2002) e são considerados bons indicadores de efeitos tóxicos, pois respondem com uma alta sensibilidade produzindo poucos resultados falso-positivos (GRANT, 1994).

O principal efeito sobre o ciclo celular do *A. cepa* é a mutagenicidade, bem como aumento ou diminuição da proliferação celular de pontas de raízes tratadas com diferentes espécies de plantas (VICENTINI et al., 2001; CAMPAROTO et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2003; KNOLL et al., 2006; FACHINETTO et al., 2007). Para que se possam medir as anomalias que diferentes agentes mutagênicos venham a causar nos organismos, é imprescindível que os tratamentos estejam em contínua divisão celular. Isso é preciso, para identificar as modificações e toxicidade em todo ciclo celular, com esse intuito, o ensaio do *A. cepa* tem sido bem utilizado (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003). O índice mitótico

e de replicação, são padrões de referência para proliferação celular, e o ensaio *A. cepa* pode medir esses índices, sendo outra vantagem do teste (GADANO et al., 2002).

Além de sua ampla utilização nos ensaios de citotoxicidade/mutagenicidade de plantas medicinais, o teste de *A. cepa* pode ser utilizado para o acompanhamento da poluição ambiental e avaliação da capacidade mutagênica de inúmeros compostos químicos. Isso porque células meristemáticas de raízes de plantas são parâmetros apropriados para a determinação de resultados clastogênicos motivados por poluentes do ambiente, em particular para o controle de contaminantes da água e do solo (MA et al., 1995). O sistema teste *Allium cepa* é o mais adequado para avaliação de níveis de poluição ambiental, pois detecta toxicidade e genotoxicidade nos vegetais, e eles são representantes diretos ou indiretos de riscos para os humanos que os consomem (EL SHAHABY et al. 2003).

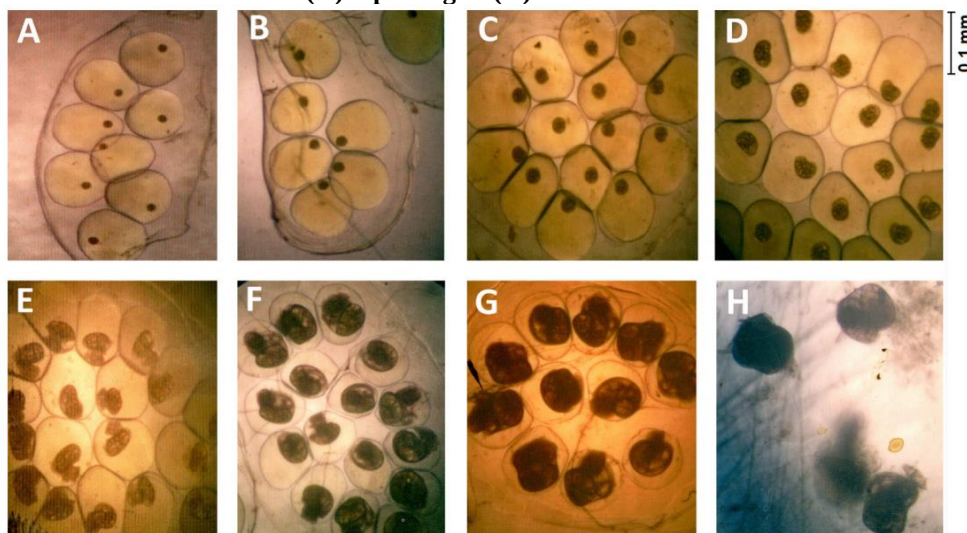
Os testes de citotoxicidade/genotoxicidade realizados pelo sistema teste de *Allium cepa* baseiam-se em diversos parâmetros de análise, como por exemplo, padrões nucleolares atípicos, os quais consistem em um grande número de células com pareamento heteromórfico de nucléolos (GROVER; KAUR, 1999). Esses testes estão validados por vários pesquisadores que realizaram de forma conjunta com o teste animal in vitro, e os resultados foram similares (TEIXEIRA et al., 2003; VICENTINI et al., 2001; FACHINETTO et al., 2007). Outros estudos têm sido realizados com sistemas testes vegetais e foi reportado uma concordância entre os sistemas teste vegetal e sistema teste de mamíferos de 75 a 91,5% (GRANT, 1994; GRANT, 1982; GROVER et al., 1990).

2.5 Bioensaio com embriões de *B. glabrata* e cercárias de *S. mansoni*

Biomphalaria glabrata é uma espécie de caramujo hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*. Ele pertence ao domínio Eukaryota, reino Animalia, subreino Eumetazoa, filo Mollusca, classe: Gastropoda ordem Basommatophora, família: Planorbidae, gênero *Biomphalaria* e espécie *Biomphalaria glabrata* (REY, 1991; NEVES, 2004; LUNA et al., 2005). O conhecimento da embriologia das espécies de *Biomphalaria* serve de base para estudos de toxicidade. Esses caramujos são bons bioindicadores de efeitos teratogênicos, pois, além de terem seu desenvolvimento embrionário (figura 7) bem descrito apresentam vantagens como a transparência das cápsulas de desovas e dos ovos e postura em mono camada que facilita a identificação dos efeitos morfogenéticos de substâncias diversas sobre os embriões (KAWANO, 1983; KAWANO; SIMÕES, 1987; KAWANO et al., 1992;

TALARICO et al., 2004; ESTEVAM et al., 2006; SILVA et al., 2008). O estudo da embriotoxicidade de um organismo como a *Biomphalaria glabrata*, se torna importante em razão de se poder comparar facilmente o embrião normal com o malformado, e em virtude disso, tem sido um organismo extremamente utilizado em experimentos com diferentes substâncias químicas ou de origem vegetal (BARBOSA, 1995).

Figura 7: Estágios do desenvolvimento do embrião de *Biomphalaria glabrata*, observado através de um estereoscópio. (A) blástula, (B) gástrula, (C) trocófora jovem, (D) trocófora, (E) véliger jovem, (F) véliger, (G) hipo-stage e (H) animais eclodidos.



Fonte: Adaptado de ALBUQUERQUE et al., 2014.

As cercárias de *Schistosoma mansoni* (figura 8) são a fase evolutiva infectante especializada em executar as funções de locomoção, encontro do hospedeiro, invasão do mesmo e de maturar-se em vermes sexualmente maduros. Ela mede cerca de 500µm, mas pode variar consideravelmente devido à habilidade de contração e alongamento (DORSEY et al., 2002). É um gênero de platelminto trematódeo digenético que, quando adulto, vive nos vasos sanguíneos do sistema porta-hepático do homem e de alguns mamíferos roedores e marsupiais (CUNHA, 1970; REY, 2001) causando a esquistossomose. Pertence ao reino Animalia, filo Platyhelminthes, classe Trematoda, subclasse Digenea ordem Strigeiformes, família Schistosomatidae, gênero *Schistosoma* e espécie *Schistosoma mansoni*. A infecção do hospedeiro definitivo ocorre quando o homem entra em contato com a água onde existem caramujos infectados liberando cercárias. Se estas larvas encontrarem o hospedeiro definitivo na água, penetram pela pele nua e intacta ou pelas mucosas (REY, 2001). KLABUNDE et al., (2000), demonstraram que os carboidratos de superfície do tegumento de cercárias e vermes adultos são ligantes de lectina.

Figura 8: *Schistosoma mansoni* - cercária.



<http://www.ufrgs.br/para-site/siteantigo/Imagensatlas/Animalia/Schistosoma%20mansoni.htm>

Estruturalmente, a cercária de *S. mansoni*, apresenta-se dividida em: órgão anterior ou ventosa oral, segmento do corpo (com cutícula recoberta de espinhos) e cauda medindo cerca de 300 µm, terminando em uma bifurcação (DORSEY et al., 2002; NEVES et al., 2005). Esta última região da cercária será perdida rapidamente no seu processo de penetração no hospedeiro definitivo.

As cercárias e embriões de *Biomphalaria* estão ligados a uma doença endêmica, silenciosa, parasitária que ocorre em diversos países dos continentes americano, africano e asiático, a esquistossomose. É uma doença transmitida por caramujos (hospedeiro intermediário) do gênero *Biomphalaria* que habitam a África e as Américas, e é causada por três espécies de *Shistosoma* (parasita): *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum* (BRICKER; BRUCE, 1978). A esquistossomose mansônica, causada pelo parasito *Schistosoma mansoni* ocorre na América do Sul (CHISTSULO et al 2000; FUNASA, 2002) e especificamente em 19 estados do Brasil, incluindo Pernambuco (REY, 2001; FUNASA, 2002; COURA; AMARAL, 2004).

Das 10 espécies de *Biomphalaria* registradas, apenas *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* são suscetíveis à infecção natural por *S. mansoni* (SOUZA; LIMA, 1990). Os caramujos hospedeiros podem ocupar vasta área geográfica devido à capacidade de adequação a diversas condições ambientais

A erradicação do caramujo para um controle efetivo é impossível, sendo assim, o controle se faz por meio da eliminação do hospedeiro intermediário de áreas onde poderia ser infectado por miracídeos (PAULINI, 1966; WHO, 1973, 1980; WEBBE, 1987).

Caramujos do gênero *Biomphalaria* são responsáveis pela maior parte da transmissão da doença, pois em seu interior, ocorre a multiplicação e formação da fase infectante do parasita (as cercárias). Dessa forma, as estratégias que envolvem o controle do caramujo e do parasita

são prioritárias para a redução da transmissão da doença em locais endêmicos (WHO, 1984; LARDANS; DISSOUS, 1998).

A avaliação da toxicidade em embriões e cercárias, além de fornecer resultados da ação de moléculas sobre a viabilidade dos organismos, também pode ser útil como ferramenta alternativa para o controle do *Schistosoma mansoni*, causador de uma doença endêmica em Pernambuco, a esquistossomose mansônica.

Com base na revisão abordada anteriormente, esse trabalho se propõe a desenvolver uma formulação lipossomal, contendo CrataBL, que possa potencializar as aplicações da lectina, minimizando danos à molécula e promovendo uma liberação mais eficiente. Além de realizar paralelamente diferentes ensaios biológicos com a lectina livre, para obtenção de resultados complementares sobre sua toxicidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Investigar a toxicidade de CrataBL livre e encapsulada em lipossomas através do ensaio hemolítico, e livre em diferentes ensaios biológicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Encapsular CrataBL em lipossomas;
- Avaliar as características físico-químicas dos lipossomas contendo CrataBL;
- Determinar a citotoxicidade em eritrócitos de CrataBL livre e encapsulada;
- Avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de CrataBL em *Allium cepa*;
- Avaliar o efeito de CrataBL sobre embriões de *Biomphalaria glabrata* e cercárias de *Schistosoma mansoni*.

4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA LECTINA DE *Crataeva tapia* (CrataBL) EM DIFERENTES ENSAIOS BIOLÓGICOS E ENCAPSULÇÃO EM LIPOSSOMAS

CINTRA, A. J. L.^a, SILVA, C. E. S.^b, CORREIA, D. S.^c, FERRAZ-CARVALHO, R. S.^a,
VIDAL, A. C. B.^c, CORREIA, M. T. S.^b, SANTOS-MAGALHÃES, N. S.^a

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

^bDepartamento de Bioquímica, Laboratório de Glicoproteínas, UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

^cDepartamento de Genética, Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV). UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

*Autor para correspondência:

Dr.^a Nereide Stela dos Santos Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco.

Grupo de Sistemas de Liberação Controlada de Medicamentos.

Laboratório de Imunopatologia KeizoAsami (LIKA).

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária 50670-901, Recife, PE, Brasil.

E-mail: nssm@ufpe.br

Resumo

Neste trabalho foram realizados diferentes ensaios biológicos (*Allium cepa*, embriotoxida e cercaricida) com a lectina na sua forma livre, para avaliação de sua toxicidade. Além disso, foi realizado a encapsulação da lectina de *Crataeva tapia*, CrataBL, em lipossomas convencionais e a avaliação da toxicidade da formulação e da lectina livre frente a eritrócitos. A lectina foi purificada por cromatografia clássica de troca catiônica e os lipossomas preparados pelo método de congelamento/descongelamento. Em *Allium cepa*, a lectina apresentou atividade citotóxica e genotóxica significativa apenas em 1000 µg / mL, porém muito baixa em relação ao controle positivo, e não apresentou efeito mutagênico nas concentrações testadas. No ensaio embriotoxida e cercaricida, a CrataBL apresentou toxicidade apenas em 500 µg / mL. Na encapsulação, os lipossomas exibiram tamanho médio de partícula de $168 \pm 0,56$ nm com uma distribuição de tamanho estreita e monodispersa (PDI = 0,407) e potencial zeta de $31,55 \pm 0,77$. A eficiência de encapsulação foi de $73 \pm 5,72$ %. No ensaio hemolítico a lectina livre e encapsulada apresentaram os seguintes graus de hemólise 0,55; 0,68; 0,72; 0,88 % e 0,34; 0,91; 0,93; 1,25; 5,37 % para as seguintes concentrações, respectivamente 50; 300; 600; 1000 µg / mL e 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg / mL. A lectina na sua forma livre apresentou em *Allium cepa*, citotoxicidade e genotoxicidade significativa, apenas na concentração de 1000 µg / mL e ausência de efeito mutagênico para as concentrações testadas. No ensaio com artêmias, embriões e cercárias, a lectina apresentou efeito tóxico significativo apenas em 500 µg / mL. Na formulação do nanossistema e avaliação hemolítica, a CrataBL foi encapsulada com eficiência e a formulação lipossomal não apresentou atividade hemolítica significativa, assim como a lectina livre, mostrando-se promissora para aplicações *in vivo*.

Palavras chave: *Crataeva tapia*. Lectina. CrataBL. Lipossoma. Toxicidade.

Introdução

As lectinas são uma classe de proteínas ou glicoproteínas estruturalmente diversas e que contêm pelo menos um domínio de ligação a carboidratos, tais como monossacarídeos e oligossacarídeos, aos quais se ligam com alta especificidade e de forma reversível e apresentam uma ampla distribuição na natureza (CORREIA et al., 2008; RATANAPO et al., 2001). Elas são extraídas de diversos organismos, como de plantas, as quais produzem uma grande variedade de biomoléculas, compostos químicos e metabólitos secundários, que exibem um amplo espectro de atividades biológicas, dentre elas: ação anticarcinogênica, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, hipolipidêmica e antimicrobiana (AHERNE; O'BRIEN, 1999; DJURIC et al., 2001; BELTRÃO et al., 2003; JOHANN et al., 2007; PAIVA et al., 2010; OOI et al., 2010; CAVALCANTE et al., 2011; PINTO et al., 2013). Entre plantas que já foram purificadas lectinas, podemos citar a *Crataeva tapia* uma planta da família *Caparidaceae*, que ocorre, entre outros estados em Pernambuco (TABARELLI; SILVA 2002). O extrato de sua casca é usado popularmente para o tratamento de diabetes, dor de estômago e febre (SHARON et al., 2001).

A CrataBL em sua estrutura primária, consiste de 164 ou 165 aminoácidos, presentes em duas isoformas distintas, e sua estrutura tridimensional, revela domínios β -folha e dois sítios de ligação a carboidratos, em cada isoforma. E entre suas atividades estudadas, têm-se a avaliação de seu efeito antiproliferativo em linhagens de células cancerosas da próstata, com inibição do crescimento de 47% das células DU145 e 43% das células PC3 (FERREIRA et al., 2013), ação antitumoral, anti-inflamatória e analgésica, (ARAÚJO et al., 2011), entre outras. É uma lectina purificada a partir do extrato aquoso da entrecasca da *C. tapia*, possui carga predominantemente positiva ($pI > 10$), e na forma nativa apresenta-se como um dímero. Além disso, essa proteína possui especificidade de ligação para glicose e galactose (ARAÚJO et al., 2012).

Tendo em vista o grande potencial da CrataBL como substância biologicamente ativa, foi avaliada sua toxicidade em diferentes ensaios biológicos, no intuito de obter informações toxicológicas para futuras aplicações da molécula. E nesse sentido, foram realizados a citotoxicidade em eritrócitos, para avaliar danos a membrana das hemácias, o teste em *Allium cepa*, para avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em células somáticas e ainda a toxicidade frente à embriões de *Biomphalaria glabrata* e cercárias de *Schistosoma mansoni*.

Em seguida foi realizado a encapsulação da CrataBL em lipossomas convencionais, visando potencializar as propriedades da lectina em um nanossistema que pudesse trazer eficiência na liberação controlada e proteção contra fluídos biológicos. E realizado a caracterização físico-química da formulação.

Desse modo, o presente trabalho propõe-se a realizar diferentes ensaios biológicos com a lectina livre, para obtenção de resultados iniciais sobre sua toxicidade. E a encapsulação e caracterização da CrataBL em lipossomas convencionais, para produção de uma nova formulação biocompatível e estável.

Materiais e Métodos

C. tapia foi coletada na cidade do Recife, PE, Nordeste do Brasil. A planta foi identificada pelo *Instituto Agrônomo de Pernambuco* (IPA), voucher (n. 61.415).

Fosfatidilcolina de soja (PC, Epikuron 200) foi obtido a partir de Lucas Meyer (Hamburgo, Alemanha). Colesterol, estearilamina, ácido fosfatídico, trealose, D (+) - ácido úsnico (98% de pureza) e o kit de dosagem protéica de Peterson-Lowry foram adquiridos a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Acetonitrilo, clorofórmio, metanol, fosfato de potássio monobásico, e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os produtos químicos eram de grau de reagente.

Purificação da lectina de *Crataeva tapia*

A lectina de *C. tapia* foi obtida através de um protocolo de purificação sequencial (ARAÚJO et al., 2012). A casca em pó (10 g) foi suspensa em NaCl a 0,15 M (100 mL). Após agitação magnética (16 h a 4 ° C), o material foi filtrado e centrifugado (4000 x g, 15 min), e o sobrenadante (extrato bruto) foi utilizado como material de partida. As proteínas solúveis em extrato bruto foram fracionadas com sulfato de amônio e o precipitado fração 30 - 60% (30 - 60 M) foi submetido a diálise, contra água destilada (2 h), seguido por 10 mM de tampão de citrato-fosfato, pH 5,5 (2 h). A fração 30-60% foi aplicada (11 mg de proteína, atividade hemaglutinante de 1024) em uma coluna cromatográfica de CM-celulose (5,2 cm x 1,6 cm) equilibrada com 10 mM de citrato-fosfato, pH 5,5. As proteínas não absorvidas foram eluídas com a solução tampão até que a absorvância a 280 nm era inferior a 0,05; CrataBL foi

eluída com NaCl 0,5 M. A concentração de proteína foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em *Allium cepa*

Para o ensaio em *Allium cepa* (LEME; MARIN-MORALES, 2008), sementes foram submetidas à germinação, em placas de Petri, contendo os diferentes tratamentos: controle negativo (C-, água destilada), controles positivos (C₁₊, metanossulfonato de metila – MMS 4×10^{-4} Mv; e C₂₊, trifluralina - TRI 0,84 ppm) e CrataBL (300; 600 e 1000 µg / mL). Em seguida, foram coletadas as raízes das sementes que germinaram, e colocadas em solução fixadora Carnoy (etanol + ácido acético glacial, 3:1), por 6-8 horas, à temperatura ambiente. Decorrido este período, trocou-se o fixador por um novo Carnoy, recém preparado. Os tratamentos foram armazenados em geladeira, até a confecção das lâminas. O teste foi conduzido sobre bancada sem movimentos e sem iluminação direta.

Para a preparação das lâminas, as raízes foram retiradas do fixador, lavadas com água destilada (3 banhos de 5 minutos) e submetidas à hidrólise com ácido clorídrico 1N à 60°C por 8 minutos. Em seguida, foram transferidas para frascos de cor âmbar contendo o reativo de Schiff (fucsina básica + metabissulfito de sódio, 3:1), permanecendo nesses por 2 horas. As raízes foram retiradas com o auxílio de uma pinça, e a coifa (porção apical) em um comprimento de aproximadamente 1-2 mm, com um bisturi. O restante foi desprezado. Foram adicionadas duas ou três gotas de carmin acético 2%. As lâminas citológicas foram preparadas por esmagamento manual. A contagem e avaliação das células foram realizadas em microscópio óptico, no aumento de 40x.

Em cada tratamento, foram examinadas 5000 células, para o cálculo dos seguintes parâmetros: índice mitótico (IM), índice de alterações cromossômicas (IAC) e índice de mutagenicidade (IMt).

Avaliação da Embriotoxicidade

Para realização do teste de embriotoxicidade (OLIVEIRA-FILHO; PAUMGARTTEN, 2000), foram separados 8 grupos contendo 300 embriões cada: controle negativo (água filtrada e declorada), controle positivo (Niclosamida) e a lectina (CrataBL) nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 500 µg / mL. Os embriões foram expostos por 24 h e analisados quanto à viabilidade (mortos e malformados) durante todo o período embrionário. O experimento foi realizado em triplicata.

Toxicidade em cercárias

Moluscos (*B. glabrata*, n=15) infectados foram expostos à iluminação artificial para a eliminação das cercárias. As cercárias foram expostas ao extrato, fração e CrataBL nas concentrações de 300; 400; e 500 µg / mL. O controle negativo foi água destilada (pH 7,0). Cada grupo foi formado por 50 cercárias, em triplicata. O comportamento das larvas foi avaliado após 15, 30, 60 e 120 min. A análise da toxicidade em cercárias foi feita de acordo com os seguintes parâmetros padrões: mortalidade total: 100 % de cercárias mortas (++++); toxicidade forte: mais de 90 % de cercárias mortas (+++); toxicidade média: entre 50-90 % das cercárias mortas (++); Inativo: menos de 50 % do cercárias mortas (+) e grupo controle: 100 % do cercárias vivas (-) (DOS SANTOS et al., 2007).

Preparação e caracterização dos lipossomas contendo CrataBL

Os lipossomas convencionais contendo a CrataBL, na concentração de 1000 µg / mL, foram obtidos pela técnica de congelamento/descongelamento (CUNHA et al., 2016). Os lipídios (80 mM), fosfatidilcolina de soja (PC), colesterol (CH) e estearilamina (SA) (70/20/10) foram solubilizados separadamente em uma solução de clorofórmio/metanol (3/1), e em seguida colocados em uma única solução. Posteriormente foi submetida à rotaevaporação sob pressão reduzida, até a formação de um filme lipídico uniforme. O filme lipídico foi hidratado com uma solução contendo CrataBL, em 5 mL de tampão fosfato (pH 7,4) sob agitação. A formulação de lipossomas multilamelares (MLV's) foi submetida a dois ciclos de congelamento/descongelamento (-80 °C; 7 min/25 °C; 7 min). Posteriormente, os lipossomas foram submetidos a sonicação (500 W, 50 Hz, pulsante) por 75s para obtenção de lipossomas unilamelares (SUV).

Os lipossomas foram caracterizados através da determinação do tamanho médio das vesículas, índice de polidispersão, carga de superfície das vesículas e eficiência de encapsulação da lectina. O tamanho e o índice de polidispersão foram avaliados no aparelho Delsa™ Nano S (Beckman Coulter, UK). Já a carga de superfície utilizou o equipamento Zetatrak Legacy (Microtrac, EUA) (por mobilidade eletroforética). Para avaliação foram realizadas previamente diluições da formulação em água deionizada (25°C). Os resultados foram expressos em média ± D.P., os quais foram obtidos através de três experimentos independentes. A eficiência de encapsulação será descrita no próximo subitem.

Eficiência de encapsulação

Para o doseamento da CrataBL, uma alíquota de 150 µL de lipossomas foi diluída em 50 µL de uma solução de clorofórmio/metanol (3:1) e sonicada por 7 min. Posteriormente, o volume foi ajustado para 1 mL com água deionizada e o conteúdo de proteína foi medido utilizando um Kit de Peterson-Lowry, segundo as instruções do fabricante.

A eficiência de encapsulação da CrataBL nos lipossomas foi determinada após submissão da preparação lipossomal a técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação utilizando unidades filtrantes Vivaspin 300[®] (Sartorius). A amostra lipossomal (150 µL) foi colocada na unidade filtrante e centrifugada (Ultracentrifuge KT-20000, Kubota, Japão) a 14.000 rpm por 30 min a 4 °C seguida da quantificação da proteína no sobrenadante utilizando o Kit de Peterson-Lowry, segundo as instruções do fabricante. A taxa de encapsulação foi calculada pela diferença entre o teor de CrataBL nos lipossomas (total) e a concentração dosada no sobrenadante (não encapsulada). $EE\% = \frac{[CrataBL]_{lipossomas} - [CrataBL]_{sobrenadante}}{[CrataBL]_{lipossomas}} \times 100$.

Determinação da atividade hemolítica de CrataBL livre e encapsulada

Para o ensaio hemolítico (COSTA-LOTUFO et al., 2005) sangue do tipo O (5 a 10 ml) foi obtido por punção venosa e colocado em tubos contendo anticoagulate alsever (A3551 Sigma-Aldrich). Os eritrócitos foram lavados três vezes por centrifugação (1500 rpm, 10 min a 4 °C) com solução salina fisiológica (0,9%). Cada tubo recebeu 1,1 ml de suspensão de eritrócitos (1%) e 0,4 ml de concentrações pré-determinadas de CrataBL livre (50; 300; 600 e 1000 µg / mL) e encapsulada (62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg / mL). Os controles foram solução salina (NaCl 0,15M - negativo) e triton 100 (positivo). Após incubação por 60 min as células foram centrifugadas por 5 min e a absorvância do sobrenadante foi registrada a 545 nm. A atividade hemolítica foi expressa pela seguinte fórmula: Atividade Hemolítica (%) = $\frac{(As - Ab)}{(Ac - Ab)} \times 100$, onde Ab = absorbância do controle (-), As = absorbância da amostra; Ac = absorbância do controle (+).

Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad Prism 7.00. As diferenças entre as médias foram analisadas utilizando ANOVA (one way), seguida pelo teste Tukey, com múltiplas comparações. Os valores foram considerados significativos (*) quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em *Allium cepa*

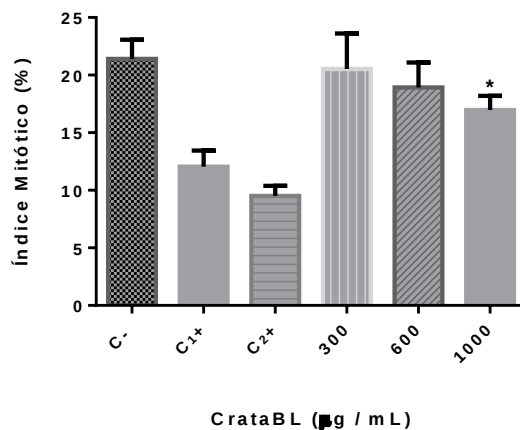


Figura 1: Citotoxicidade da CrataBL (300, 600 e 1000 µg / mL) em células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, através do índice mitótico (IM). C- (Controle negativo: Água destilada), C1+ (Controle positivo: MMS, metil metano-sulfonato), C2+ (Controle positivo: Trifluralina). * p<0,05.

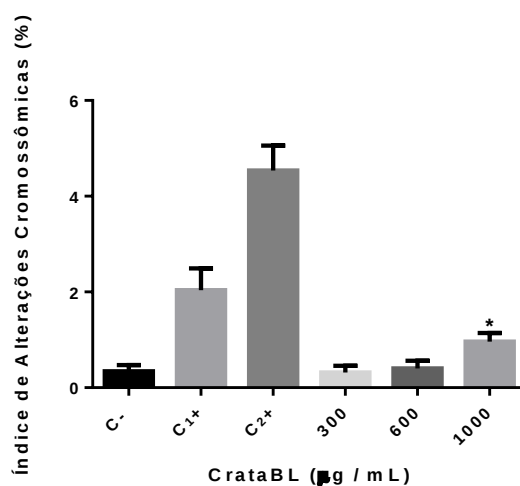


Figura 2: Genotoxicidade da CrataBL (300, 600 e 1000 µg / mL) em células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, através do índice de alterações cromossômicas (IAC). C- (Controle negativo: Água destilada), C1+ (Controle positivo: MMS, metil metano-sulfonato), C2+ (Controle positivo: Trifluralina). * p<0,05.

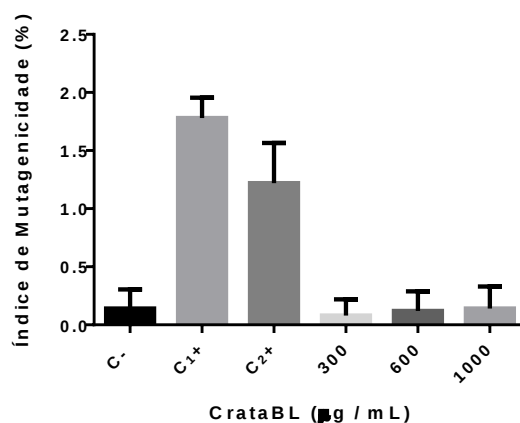


Figura 3: Mutagenicidade da CrataBL (300, 600 e 1000 µg / mL) em células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, através do índice de mutagenicidade (IMt). C- (Controle negativo: Água destilada), C1+ (Controle positivo: MMS, metil metano-sulfonato), C2+ (Controle positivo: Trifluralina). ns p<0,05.

A CrataBL foi avaliada em (300, 600 e 1000 µg / mL), quanto à citotoxicidade, através do índice mitótico (figura 1). A lectina apresentou uma atividade citotóxica significativa para a células de *A. cepa* apenas na concentração de 1000 µg / mL ($p < 0,05$), apresentando redução do índice mitótico. As outras concentrações não foram significativamente citotóxicas. O presente estudo demonstrou que a CrataBL, na concentração de 1000 µg / mL, provocou citotoxicidade para células de *A. cepa*, sugerindo que em concentrações superiores a esta, a CrataBL apresente potencial risco de citotoxicidade para células não-tumorais.

Na avaliação genotóxica (figura 2), foi verificado que a CrataBL apresentou uma frequência total significativa de alterações cromossômicas apenas em 1000 µg / mL ($p < 0,05$), indicando que nesta concentração, a lectina provocou genotoxicidade. As alterações cromossômicas são modificações estruturais resultantes de quebra ou mudança no material cromossômico. A maioria delas é letal às células meristemáticas de *A. cepa*. No entanto, algumas podem se tornar viáveis e não causar efeitos genéticos (ASKIN; ASLANTURK, 2007).

Quanto à mutagenicidade (figura 3), a CrataBL não foi mutagênica nas 3 concentrações testadas. A mutagenicidade é avaliada através do número de micronúcleos nas células. Eles são formados a partir do desenvolvimento de algumas alterações cromossômicas que não foram reparadas ou foram indevidamente (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Como o teste não detectou um índice de mutagenicidade significativo (micronúcleos), provavelmente, as alterações cromossômicas induzidas pela CrataBL foram reparadas.

Outros estudos relatam o uso de *Allium cepa* para avaliação de toxicidade, GRISOLIA e TAKAHASHI (1990) usaram o sistema teste vegetal *Allium cepa* para o estudo dos efeitos de metildopa (fármaco antihipertensiva), indicando uma diminuição do índice mitótico de *Allium cepa* em todas as concentrações testadas e também a possível toxicidade da droga. Extratos de várias espécies de plantas medicinais têm sido estudados frente ao *Allium cepa* para análise de genotoxicidade, tais como: *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* L. Skeels, *Cissus sicyoides* L (VICENTINI et al., 2001); *Maytenus ilicifolia* Mart., *Bauhinia candicans* Benth (CAMPAROTO et al., 2002) *Psidium guajava* L., *Achillea millefolium* L. (TEIXEIRA et al., 2003). A dermaseptina 01 (DS 01), um peptídeo antimicrobiano extraído da pele de rãs, apresentou toxicidade e citotoxicidade significativa em células de *A. cepa*, na concentração de 50 µg / mL. Nesta mesma concentração, o peptídeo não provocou efeitos mutagênicos significativos. Concentrações menores (25 e 12,5 µg / mL) não foram genotóxicas (JÚNIOR, 2012).

Estudos com a lectina Bmoll demonstraram que ela foi incapaz de aumentar a frequência de mutação (SISENANDO, 2009). A WSMoL não foi um agente genotóxico/mutagênico nas concentrações estudadas (ROLIM, 2007).

Os testes de citotoxicidade utilizando sistema teste vegetal *in vivo*, como o de *Allium cepa*, estão validados por vários pesquisadores que realizaram de forma conjunta teste animal *in vitro*, utilizando células de medula de rato Wistar e os resultados foram similares (TEIXEIRA et al., 2003; VICENTINI et al., 2001; FACHINETTO et al., 2007). Outros estudos têm sido realizados com o sistema teste *Allium cepa*, e foi reportado uma concordância entre o sistema teste vegetal e o sistema teste de mamíferos de 75 a 91,5% (GRANT, 1994; GRANT, 1982; GROVER et al., 1990).

Avaliação da Embriotoxicidade

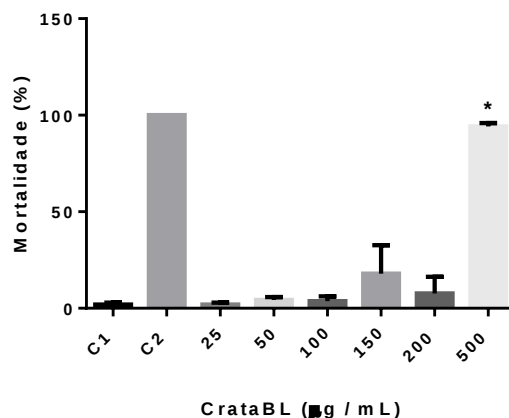


Figura 4: Avaliação da embriotoxicidade da glicoproteína CrataBL (25, 50, 100, 150, 200 e 500 µg / mL) por 24h. C1 (Controle Negativo, Água filtrada) e C2 (Controle Positivo, Niclosamida – NCL). * $p < 0,05$.

A CrataBL foi avaliada nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 500 µg / mL. Foi observado efeito embriotóxico dos embriões de *B. glabrata* expostos a lectina (CrataBL) na concentração de 500 µg / mL, onde foi demonstrado inviabilidade de 94% dos embriões expostos a lectina. No entanto, as concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 µg / mL não apresentaram percentuais de inviabilidade significativamente diferente ao do grupo controle negativo (C1) (figura 4). Em nenhuma das concentrações foi observado efeito teratogênico nos embriões. Da mesma forma, não foi verificada nenhuma má-formação em nenhum dos estágios do desenvolvimento (blástula, gástrula, trocófora jovem, trocófora, véliger jovem, véliger, hipo-stage e animais eclodidos). Os embriões que se mantiveram vivos se desenvolveram normalmente.

Estudos realizados com lectinas de *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (CfeLL, CfeBL e CfePL) apresentaram atividade embriotóxica apenas para CfePL e CfeLL nas concentrações testadas, com CL50 de CfeLL e CfePL de 36,30 e 94,95 µg / mL, respectivamente (FREITAS, 2012). Outra lectina, a MvRL interferiu com o desenvolvimento embrionário e a viabilidade de uma forma dependente da dose, incluindo concentrações que não promoveram a mortalidade no ensaio. A maioria dos embriões tratados com a lectina em concentrações de 10 e 100 µg / mL (95,2 e 100%, respectivamente) não se desenvolveram (ALBUQUERQUE et al., 2014). Estudos centrados na embriotoxicidade de lectinas de plantas *Lytechinus variegatus* (ouriço do mar) relataram que estas proteínas promovem a desagregação e a destruição das células, através do reconhecimento de oligossacarídeos na superfície da célula embrionária (MACEDO et al., 2005). KHURRUM et al. (2004) sugeriram

que a endocitose de lectinas pelo embrião, pode levar ao reconhecimento de oligossacarídeos ou glicoconjugados, gerando malformação ou morte.

Toxicidade em cercárias

Tabela 1: Toxicidade da lectina, fração e extrato ($\mu\text{g} / \text{mL}$), frente a cercárias de *Schistosoma mansoni*.

	Concentração ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Nº de Cercárias	Tempo de exposição (em minutos)			
			15	30	60	120
Lectina	Controle (-)	50	-	-	-	-
	300	50	-	-	-	-
	400	50	-	-	-	-
	500	50	-	-	+	+
Fração	Controle (-)	50	-	-	-	-
	300	50	-	-	+	+
	400	50	-	+	+	++
	500	50	-	++	++	+++
Extrato	Controle (-)	50	-	-	-	-
	300	50	-	-	-	+
	400	50	-	+	+	++
	500	50	-	++	++	++

(-) Grupo controle: 100 % das cercárias vivas e móveis; (+) Inativo: menos do que 50 % das cercárias mortas; (+ +) Toxicidade Média: 50-90 % de cercárias mortas; (+ + +) Toxicidade forte: 90 % ou mais das cercárias mortas (+ + + +) Letalidade completa: 100 % das cercárias mortas.

A lectina, fração e extrato foram avaliados em três concentrações 300, 400 e 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ em quatro intervalos de tempo (15, 30, 60 e 120 min) (tabela 1). A lectina apresentou-se tóxica na concentração de 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ nos intervalos de 60 e 120 min, e não tóxica em 300 e 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$ em todos os intervalos. Porém o extrato e a fração apresentaram toxicidade para todas as concentrações. O que indica que componentes com maior toxicidade estão presentes nesses compostos, quando comparado à lectina. A fração foi tóxica em: 300, 400 e 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, sendo 300 $\mu\text{g} / \text{mL}$ apenas nos intervalos de 60 e 120 min, e 400 e 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ em 30, 60 e 120 min, com níveis de toxicidades diferentes. O extrato como já citado, apresentou toxicidade em todas as concentrações: 300, 400, 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 300 no intervalo de 120 min, e 400 e 500 em 30, 60 e 120 min, também com níveis de toxicidades diferentes. Houve proporcionalidade entre as concentrações testadas, tempo de exposição e o efeito tóxico.

Alterações de motilidade e aderência foram observadas nas cercárias sobreviventes, dos três grupos, bem como separação de corpo cercariano e cauda nas concentrações de 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ para a lectina, e 300, 400 e 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ para o extrato e a fração.

KLABUNDE et al. (2000), demonstraram, usando fluorescência e microscopia eletrônica de varredura, que os carboidratos de superfície do tegumento de cercárias e vermes adultos são ligantes de lectina (MBL, lectina ligante de manose). Mas a CrataBL não apresentou forte toxicidade, indicando que mesmo a possível existência de outros carboidratos, os mesmos não teriam especificidade pela CrataBL (ligante de glicose/galactose) ou que não estariam associados com a toxicidade do organismo.

A atividade cercaricida do extrato aquoso de *Indigofera Suffruticosa* também revelou toxicidade em todas as concentrações testadas (FIGUEIREDO, 2011), assim como o do presente estudo.

Dessa forma, podem-se empreender estudos para investigar quais substâncias ou metabólitos estão presentes no extrato e na fração que estão ligados a essa toxicidade. Podendo extrair um produto específico e seletivo, minimizando danos ao organismo.

Encapsulação e caracterização da CrataBL em lipossomas

A formulação lipossomal (Lipo-CrataBL) apresentou-se estável, com reflexo azulado (efeito tyndall), homogênea e sem presença de precipitados. Os lipossomas exibiram tamanho médio de partículas de $168 \pm 0,56$ nm e com uma distribuição de tamanho monodispersa (PDI = 0,407). O potencial zeta, que corresponde à carga de superfície das vesículas foi de $31,55 \pm 0,77$ mV. A eficiência de encapsulação da lectina nos lipossomas foi de $73 \pm 5,72$ %.

Os resultados correlacionam-se com o trabalhos de CUNHA et al. (2016), no qual obteve pelo mesmo método de preparação, congelamento/descongelamento, tamanho médio das vesículas de $168 \pm 0,7$ nm e PDI $0,265 \pm 0,025$, e uma taxa de encapsulação de $57,3\% \pm 0,3$ através da técnica de ultracentrifugação, onde o sobrenadante foi dosado quanto ao seu conteúdo protéico com o Kit de dosagem Peterson-Lowry (SIGMA), assim como no presente estudo.

Os lipossomas contendo CrataBL exibiram tamanho médio de partículas de $168 \pm 0,56$ nm, sendo importante para futuras aplicações antitumorais, pois segundo Allen e Cullis (2013) lipossomas com tamanho < 200 nm são ideais para terapia antitumoral, pois mesmo sem o direcionamento específico, nanossistemas com diâmetro menor que 200 nm tem mostrado habilidade para se acumularem passivamente nos sítios onde há aumento da permeabilidade vascular. Esse dado é interessante para a aplicação da CrataBL, pois a mesma possui efeito antiproliferativo frente a linhagens de células cancerosas da próstata, com

inibição do crescimento de 47% das células DU145 e 43% das células PC3 (FERREIRA et al, 2013). Ainda sobre o tamanho, os lipossomas convencionais desse estudo e lipossomas peguizados de Cunha et al. (2016), ambos formulados pela método congelamento/descongelamento, apresentaram tamanhos de partículas menores que os lipossomas de Andrade et al. (2004), o qual utilizou o método de formação de filme lipídico seguido de evaporação do solvente orgânico. Isso pode indicar que o primeiro método citado possa produzir lipossomas com tamanho médio de partículas menores em relação ao segundo.

Outras pesquisas envolvendo lectinas e lipossomas têm-se mostrado promissoras. A lectina *Canavalia ensiformes* (ConA) foi ligada na superfície externa de lipossomas biomiméticos e imobilizada em bicamadas planas, com composição lipídica semelhante à das membranas celulares da retina, para avaliação da interação de derivados de porfirina manossilados, com vista no acúmulo de fotossensibilizadores, para tratamento de retinoblastomas (MAKKY et al., 2011). Em outra pesquisa, também com a lectina ConA, os lipossomas revestidos com a ConA (sítio-específicos/imunolipossomas) e carregados com DOX (doxorubicina, fármaco amplamente utilizado na quimioterapia do câncer) inibiu em 50% a proliferação de células HEP-2, em contraste com DOX livre (ROLIM-SANTOS et al, 2006). A aglutinina do germe de trigo (WGA), a lectina do tomate (TL) e a aglutinina do *Ulex europaeus* 1 (UEA-1) revestindo a superfície externa de lipossomas (sítio-específicos) contendo insulina, aumentaram a biodisponibilidade em 21,40, 16,71 e 8,38 % (WGA, TL e UEA-1, respectivamente), em camundongos diabéticos, quando comparados a formulação não modificada (ZHANG et al., 2005). A encapsulação da lectina recombinante de *Cratylia mollis* (rCramoll) em lipossomas peguizados (de longa circulação) apresentou um aumento significativo de 12 % no potencial de inibição do crescimento tumoral em relação à proteína livre (CUNHA et al., 2016). Lectinas, UEA-1, revestindo lipossomas (sítio-específicos), favoreceram significativamente a absorção pelo trato gastrointestinal (10,5 %) com relação a lipossomas convencionais (3,2 %) (CHEN et al., 1996). Encapsulação de antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) em lipossomas (sítio-específicos) revestidos com a lectina UEA-1 foram desenvolvidos para aumentar a captação transmucosa por células-M da placa de Peyer, mostrando que esses lipossomas poderiam ser promissores para o desenvolvimento de vacinas para esse tecido (GUPTA; VYAS, 2011). Lipossomas (MLV's) revestidos com um conjugado de carbopol (polímero hidrossolúvel) - lectina (WGA) foram capazes de aumentar o efeito farmacológico da calcitonina (hormônio peptídico) administrada oralmente. Por exemplo, no tempo de 24h (após administração) houve uma diminuição de cerca de 15% do

nível de cálcio no sangue, comparado com os lipossomas revestidos apenas com carbopol (WERLE; MAKHLOF; TAKEUCHI, 2010). Além disso, a eficácia farmacológica da calcitonina encapsulada em lipossomas revestidos com carbopol e lectina-carbopol, foi aumentada em mais de 3 e 20 vezes, respectivamente, após a administração peroral, comparados com os lipossomas não modificados (MAKHLOF, 2011). O revestimento de lipossomas (sítio-específicos) com lectinas também são relevantes, porque macrófagos possuem receptores glicoprotéicos, que reconhecem e endocitam esses nanossistemas, o que é importante para combater doenças inflamatórias, por exemplo (KELLY; JEFFERIES; CRYAN, 2011).

Determinação da citotoxicidade em eritrócitos do extrato, fração e CrataBL

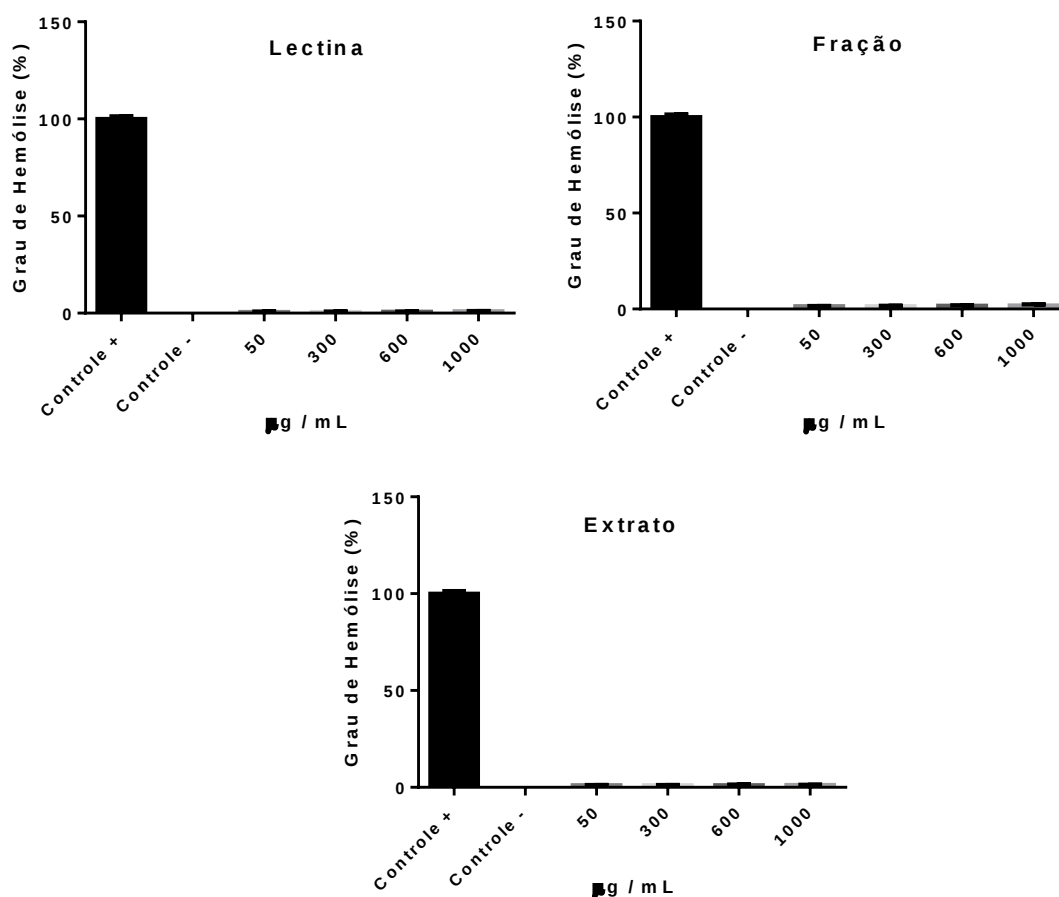


Figura 5: Citotoxicidade eritrocitária da Lectina, fração e extrato (50; 300; 600 e 1000 µg / mL). Controle + (Triton 100) e Controle - (NaCl 0,15M).

Determinação da citotoxicidade em eritrócitos de CrataBL encapsulada

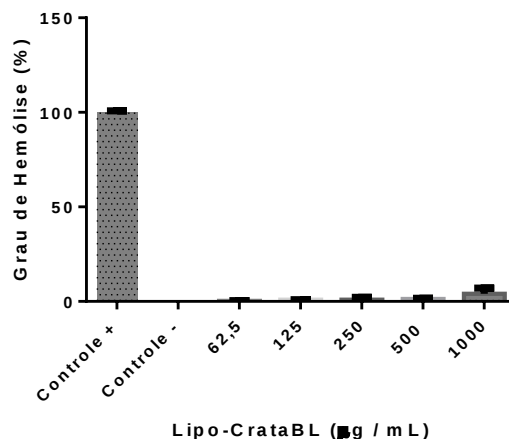


Figura 6: Citotoxicidade eritrocitária da CrataBL encapsulada (62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg / mL). Controle + (Triton 100) e Controle – (NaCl 0,15 M).

No ensaio hemolítico a lectina, fração e extrato (figura 5) apresentaram os seguintes graus de hemólise (0,55; 0,68; 0,72 e 0,88 %), (1,38; 1,47; 1,67 e 1,87 %), (1,02; 1,08; 1,12 e 1,15 %), para as seguintes concentrações (50; 300; 600; 1000 µg / mL). A lectina encapsulada apresentou (0,34; 0,91; 0,93; 1,25; 5,37 %), para (62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg / mL).

A CrataBL apresentou um baixo grau de hemólise quando comparado com o controle positivo. Outros estudos com lectinas também revelam essa baixa toxicidade frente a eritrócitos, como: as lectinas de *Moringa oleifera*, cMoL e a WSMoL, que não apresentaram atividade hemolítica (ARAÚJO et al., 2013), a lectina de sementes de feijão da praia (*Canavalia marítima*) que não promoveu hemólise em eritrócitos humanos dos tipos A, O e AB (FARIAS, 2013), lectina do veneno de *Bothrops leucurus* (BIL) também foi testada quanto à atividade lítica em eritrócitos e os resultados mostraram que não houve danos a membrana mesmo em concentrações superiores 2000 µg / mL (SANTOS-NUNES et al., 2011), lectina de *Bothrops jararacussu* (BjcuL) apresentou atividade hemolítica praticamente nula nas condições testadas, em todas as amostras analisadas, o percentual de hemólise foi sempre inferior a 2,5 % (KAYANO, 2006), lectina purificada da esponja marinha *Cinachyrella apion* (CaL) também foi avaliada quanto a sua atividades hemolítica, e o resultado mostrou que CaL não é tóxica para eritrócitos (RABELO, 2011), lectina de *C. fairchildiana* não promoveu danos à membrana de células sanguíneas humanas visto que induziu baixa atividade hemolítica frente a eritrócitos humanos tipos A (0% em todas as concentrações), B (3,46 % a uma concentração de 1000 µg / mL) e O (2,09 %, 1,74 %, 1,04 % e 5,4 % nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg / mL, respectivamente) (LEITE, 2012).

Algumas lectinas não causam hemólise, e isso reflete a sua especificidade de interação com diferentes açúcares que não estão ligados a formação de poros e permeabilidade celular, não causando lise eritrocitária.

Além das lectinas, estudos também avaliam a ação de extratos e frações frente a eritrócitos, com vista a obter dados sobre componentes desses produtos. Por exemplo, o extrato aquoso de *Moringa oleifera*, que teve sua ação avaliada e não apresentou atividade hemolítica (ARAÚJO et al., 2013). Além do extrato de Moringa, vinte espécies de extratos foram testados e apenas dois apresentaram atividade hemolítica (extratos de *Petromica citrina* e *Acervochalina sp.*) (DRESCH et al., 2005). Extrato acetônico de sementes de *Annona muricata L.* (AMSA) não foi capaz de lisar células vermelhas até a concentração máxima testada (200 µg / mL) (RIOS, 2013). Os extratos protéicos de *Swartzia laevicarpa*, *Swartzia argentea*, *Swartzia ingifolia*, *Swartzia longistipitata*, *Swartzia pendula*, *Swartzia polyphylla* e *Swartzia serice* exibiram forte atividade hemolítica para os eritrócitos de coelho e de rato (FERNANDES, 2012). Extratos alcoólicos de *Aegle marmelos*, *Tribulus terrestris*, e *Cuscuta reflexa*, apresentaram hemólise em 395,8, 622,7 e 846,9 µg / mL, respectivamente (COSTA-LOTUFO et al., 2005). Fração 0-80 % das folhas de *Daucus carota* (1, 10, 100, 1000 µg / mL) apresentou hemólise de 2,2% e 4,4% apenas em 100 e 1000 µg / mL, respectivamente (LEITE, 2010). Frações alcoólicas de *Buddleja stachyoides* apresentaram hemólise em 50 e 100 µg / mL (MARINS-OCAMPOS et al., 2013). Pode-se observar correlação desses resultados com os do presente estudo, pois mesmo na concentração de 1000 µg / mL, não foram constatados graus de hemólise significativos para o extrato e fração.

A atividade hemolítica, de extratos e frações, se deve a presença de saponinas que possuem ação sobre membranas (ação hemolítica), alterando sua permeabilidade e causando a destruição das células sanguíneas (SIMÕES et al., 2001). Presença de hemolisinas, enzimas líticas, também pode estar ligada a hemólise desses produtos (KONOZY et al., 2002). Isso sugere que não há quantidades elevadas desses componentes no extrato e fração testados, pois os mesmos apresentaram baixo grau de lise eritrocitária.

A formulação lectina-lipossoma apresentou baixo grau de hemólise (figura 6), como esperado. Pois os lipossomas são constituídos basicamente por fosfolipídeos (podendo ser de natureza sintética ou natural), esteróis e um antioxidante (alfa-tocoferol, por exemplo) (VEMURI; RHODES, 1995), o que proporciona compatibilidade para células sanguíneas. Além disso, os lipossomas, dentre outros objetivos, são formulados para minimizar possíveis

citotoxicidades em células normais e melhorar a toxicidade em células cancerígenas, por exemplo, Chou et al. (2006) avaliaram a atividade da doxorubicina encapsulada em lipossomas furtivos (Lipo-Dox[®]) em pacientes com carcinoma ovariano epitelial. Onde foi constatada a eficácia da Lipo-Dox[®] frente a essa linhagem e verificado um perfil de baixa toxicidade, com avaliação de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e de imagem. Também foi verificado diminuição da cardiotoxicidade e neutropenia da doxorubicina encapsulada em lipossomas (BATIST et al., 2001). Kuznetsova et al. (2012) verificaram em seu estudo, que os lipossomas contendo metotrexato e melfalan não provocaram alterações na contagem de células vermelhas, plaquetas e na taxa de hemólise.

Conclusão

A lectina na sua forma livre apresentou em *Allium cepa*, citotoxicidade e genotoxicidade apenas na concentração de 1000 µg / mL e ausência de efeito mutagênico nas concentrações testadas. No ensaio com embriões e cercárias, a lectina apresentou efeito tóxico apenas em 500 µg / mL. A CrataBL foi encapsulada em lipossomas com êxito e a formulação lipossomal se demonstrou estável, homogênea e com tamanho de partícula ideal para atividade antitumoral, e não apresentou atividade hemolítica, bem como a lectina livre, mostrando-se promissora para aplicações *in vivo*.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-MCTI) pelo apoio financeiro (PQ 311232/2013-2; LARnano 402282/2013-2). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) e ao Ministério da Educação do Brasil.

Referências

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. The flavonoids, myricetin, quercetin and rutin, protect against cholestan-3β, 5α, 6β-triol - induced toxicity in chinese hamster ovary cells in vitro. **Nutrition Research.**, v. 19, n. 5, p. 749-760, 1999.

- ALBUQUERQUE, L. P. et al. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**, v. 138, p. 23-27, 2014.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 36–48, 2013.
- ANDERSON, J. E. et al. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochemical Analysis**, v. 2, n. 3, p. 107-111, 1991.
- ANDRADE, C. A. S. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 2, p. 435–445, 2004.
- ARAÚJO, L. C. C. et al. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. e81973, 2013.
- ARAÚJO, R. M. S. et al. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, p. 20-26, 2012.
- ARAÚJO, R. M.S. et al. Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 1, n. 2, p. 97-100, 2011.
- ASKIN, C. T.; ASLANTURK O. S. Cytotoxic and genotoxic effects of *Lavandula stoechas* aqueous extracts. **Biologia**, v. 62, n. 3, p. 292-296. 2007.
- BARAHONA, M. V.; SANCHEZ-FORTUN, S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environmental Pollution**, v. 104, n. 3, p. 469-476, 1999.
- BATIST, G. et al. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 5, p. 1444-1454, 2001.
- BELTRÃO, E. I. et al. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningotheelial tumor. **European Journal of Histochemistry**, v. 47, n. 2, p. 139-142, 2003.
- CAMPAROTO, M. L. et al. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion roottip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 85-89. 2002.
- CAVALCANTE, T. T. A. et al. Effect of lectins from *Diocleinae* subtribe against oral *Streptococci*. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3530-3543, 2011.
- CHEN, H., TORCHILIN, V., LANGER, R. Lectin-bearing polymerized liposomes as potential oral vaccine carriers. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 9, p. 1378-1383, 1996.
- CHOU, H. et al. Pegylated liposomal doxorubicin (Lipo-Dox®) for platinum-resistant or refractory epithelial ovarian carcinoma: A Taiwanese gynecologic oncology group study with long-term follow-up. **Gynecologic Oncology**, v. 101, n. 3, p. 423-428, 2006.
- CORREIA, M. T. S. et al. Lectins carbohydrate recognition molecules: are they toxic? **Recent Trends in Toxicology**, v. 37, p. 47–59, 2008.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 21-30, 2005.

CUNHA, C. R. A. et al. Encapsulation into Stealth Liposomes Enhances the Antitumor Action of Recombinant Cratylia mollis Lectin Expressed in Escherichia coli. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

DJURIC, Z. et al. Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. **Cancer Letters**, v. 172, n. 1, p. 1-6, 2001.

DOS SANTOS, A. F. et al. The lethality of Euphorbia conspicua to adults of Biomphalaria glabrata, cercaria of Schistosoma mansoni and larvae of Artemia salina. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 135-139, 2007.

DRESCH, R. R. et al. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porífera) nativas da costa atlântica do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 16-22, 2005.

FACHINETTO, J. M. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de Achyrocline satureioides DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de Allium cepa. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 49-54, 2007.

FARIAS, D. L. **Isolamento, purificação e atividades biológicas de uma nova lectina de sementes de feijão da praia (Canavalia Maritima)**. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em biologia celular e molecular). Centro de Ciências Exatas e da Natureza. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2013.

FERNANDES, A. V. **Caracterização bioquímica e avaliação da atividade antifúngica de lectinas de sementes de Fabaceae da Amazônia**. 2012. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas. Manaus. 2012.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of Allium cepa exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FERREIRA, R. S. et al. Crystal Structure of Crataeva tapia Bark Protein (CrataBL) and Its Effect in Human Prostate Cancer Cell Lines. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. e64426, 2013.

FIGUEIREDO, E. S. **Efeitos tóxicos dos extratos aquosos e hidroalcoólicos de Indigofera Suffruticosa sobre Biomphalaria glabrata, cercárias de Schistosoma mansoni e larvas de Artemia salina**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia). Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2011.

FREITAS, A. C. C. **Atividades biológicas de preparações obtidas de Libidibia (Caesalpinia) ferrea var. parvifolia (Mart. ex Tul.) LP Queiroz**. 2012. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2012.

FRÉZARD, F. et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

FRÉZARD, F. Liposomes: From Biophysics to the design of peptide vaccines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 2, p. 181-189, 1999.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the US Environmental Protection Agency gene-tox program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

GRISOLIA, C. K.; TAKAHASHI, C. S. Evaluation of mutagenic effect of the antihypertensive drug methyldopa (Aldomet) on mammalian systems in vivo and in vitro and on *Allium cepa*. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 259, n. 2, p. 127-132, 1990.

GUPTA, P. N.; VYAS, S. P. Investigation of lectinized liposomes as M-cell targeted carrier-adjuvant for mucosal immunization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 1, p. 118-125, 2011.

JOHANN, S. et al. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 632-637, 2007.

JÚNIOR, J. J. L. A. **Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de rãs: citotoxicidade in vitro em células tumorais humanas e genotoxicidade em *Allium cepa* e linfócitos sanguíneos humanos**. 2012. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Piauí. Teresina. 2012.

KAYANO, A. M. **Isolamento, caracterização bioquímica e funcional de lectina do veneno de *Bothrops jararacussu***. 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental). Fundação Universidade Federal de Rondônia. Porto Velho. 2006.

KELLY, C.; JEFFERIES, C.; CRYAN, S. A. Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages. **Journal of Drug Delivery**, 2011.

KHURRUM, M. et al. Carbohydrate involvement in cellular interactions in sea urchin gastrulation. **Acta Histochemica**, v. 106, n. 2, p. 97-106. 2004.

KLABUNDE, J. et al. *Schistosoma mansoni*: adhesion of mannan-binding lectin to surface glycoproteins of cercariae and adult worms. **Experimental Parasitology**, v. 95, n. 4, p. 231-239, 2000.

KONOZY, E. H. E. et al. Purification, some properties of a D-galactose-binding leaf Iectin from *Eiythrina indica* and further characterization of seed Iectin. **Biochimie**, v. 84, n. 10, p. 1035-1043. 2002.

KUZNETSOVA, N. R. et al. Hemocompatibility of liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan in the lipid bilayer. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 394-400, 2012.

LEITE, J. F. M. **Propriedades bioativas e caracterização bioquímica de uma lectina purificada a partir de sementes de *Clitoria fairchildiana* RA Howard**. 2012. 86 f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Centro de Ciências. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2012.

LEITE, M. C. A. **Caracterização nutricional e atividade biológica de folhas orgânicas de cenoura (*Daucus carota* L.)**. 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2010.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACEDO, N. M. R. et al. Embryotoxic activity and differential binding of plant-derived carbohydrate-recognizing proteins towards the sea urchin embryo cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, n.1-2, p. 90–97, 2005.

MAKHLOF, A. et al. In vitro and in vivo evaluation of WGA–carbopol modified liposomes as carriers for oral peptide delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 216-224, 2011.

MAKKY, A. et al. Biomimetic liposomes and planar supported bilayers for the assessment of glycodendrimeric porphyrins interaction with an immobilized lectin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1808, n. 3, p. 656-666, 2011.

MARINS-OCAMPOS, F. M. et al. Physico-Chemical Assays, Hemolytic and Antimicrobial Activity of Extracts and Fractions of *Buddleja stachyoides* Cham. & *Schlttdl.(Scrophulariaceae)*. **Visão Acadêmica**, v. 14, n. 3, 2013.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; PAUMGARTTEN, F. J. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, n. 3, p. 342-350, 2000.

OOI, L. S. M. et al. Narcissus tazetta lectin shows strong inhibitory effects against respiratory syncytial virus, influenza A (H1N1, H3N2, H5N1) and B viruses. **Journal of Biosciences**, v. 35, n. 1, p. 95-103, 2010.

PAIVA, P. M. G. et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. p. 396-406, 2010.

PINTO, N. V. et al. Effects of Canavalia lectins on acute inflammation in sensitized and non-sensitized rats. **Inflammation**, v. 36, n. 3, p. 713-722, 2013.

RABELO, L. M. A. **Indução de morte celular em células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa) pela lectina da esponja *Cinachyrella apion* (CaL)**. 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Centro de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2011.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. **Plant Science**, v. 160, n. 4, p. 739–744, 2001.

- RIOS, M. E. F. **Estudo da atividade citotóxica e do potencial antitumoral do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L.(AMSA), em modelos experimentais in vitro e in vivo.** 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2013.
- ROLIM, L. A. D. M. **Purificação da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) e avaliação da genotoxicidade.** 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2007.
- ROLIM-SANTOS, H. M. L. et al. Cytotoxicity of doxorubicin-loaded Con A-liposomes. **Drug Development Research**, v. 67, n. 5, p. 430-437, 2006.
- SANTOS, A. F. et al. Toxicity of some glucose/ mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 794–798, 2010.
- SANTOS, A. F. et al. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 794–798, 2010.
- SANTOS-NUNES, E. et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, n. 1, p. 57-63, 2011.
- SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 491, p. 1-16, 2001.
- SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da Universidade UFSC, 2001.
- SIMÕES, R. C. **Purificação, caracterização físico-química e biológica de SLA: uma nova lectina extraída de sementes de *Swartzia laevicarpa* Amshoff.** 2013. 114 f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2013.
- SISENANDO, H. A. A. C. **Avaliação do potencial de mutagenicidade e toxidade da lectina hipoglicemiante de folha de *Bauhinia monandra* (pata-de-vaca).** 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2009.
- TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco.** v. 2. Recife: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente, Fundação Joaquim Nabuco, Editora Massangana, 2002. p. 609-621.
- TEIXEIRA, R. O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in vitro and in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 551-555, 2003.
- VAZ, A. F. M. et al. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1507–1513, 2010.
- VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, n. 2, p.95-111, 1995.

VICENTINI, V. E. P. et al. Averrhoa carambola L., Syzygium cumini (L.) Skeels and Cissus sicyoides L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. **Acta Scientarium**, v. 23, n. 2, p. 593-598, 2001.

WERLE, M.; MAKHLOF, A.; TAKEUCHI, H. Carbopol-lectin conjugate coated liposomes for oral peptide delivery. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 432-434, 2010.

ZHANG, N. et al. Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, n. 1, p. 247-259, 2005.

5 CONCLUSÕES

- Foram obtidos lipossomas convencionais, contendo CrataBL, pela técnica de congelamento/descongelamento;
- A formulação lipossomal apresentou-se estável, com reflexo azulado (característico de nanopartículas), homogênea e sem presença de precipitados;
- Os lipossomas exibiram tamanho médio de partículas satisfatório para aplicações *in vivo*, com uma distribuição de tamanho estreita e monodispersa;
- Lipossomas convencionais apresentando cerca de 73 % de encapsulação da proteína foram formulados;
- A lectina livre e encapsulada não apresentaram toxicidades significativas para os eritrócitos, quando comparada ao controle, sendo fundamental para futuras aplicações *in vivo*;
- Extrato e fração também não apresentaram toxicidades significativas frente a eritrócitos, quando comparados ao controle, o que indica para uma baixa concentração de saponinas e hemolisinas nesses produtos;
- Na avaliação em *Allium cepa* a CrataBL apresentou citotoxicidade e genotoxicidade significativa apenas na concentração de 1000 µg / mL, sendo muito baixa em relação ao controle positivo;
- A mutagenicidade, em *Allium cepa*, não foi verificada nas concentrações testadas, isso demonstra que as possíveis alterações causadas no DNA, foram reparadas ou eliminadas, não passando para as linhagens sucessoras;
- Nos ensaios com embriões de *Biomphalaria glabrata* e cercárias de *Schistosoma mansoni*, a lectina apenas apresentou toxicidade na concentração de 500 µg / mL. Apresentado mortalidade de 100% para embriões e uma baixa toxicidade para cercárias (< 50%);
- As cercárias também foram avaliadas com extrato e fração, e foram verificadas toxicidade em todas as concentrações testadas, podendo ser promissor para combater esse organismo.

REFERÊNCIAS

- ABU-DAHAB, R.; SCHAFER, U. F.; LEHR, C. M. Lectin-functionalized liposomes for pulmonary drug delivery: effect of nebulization on stability and bioadhesion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, p. 37-46, 2001.
- ABU-DAHAB, R.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C. M. Lectin-functionalized liposomes for pulmonary drug delivery: effect of nebulization on stability and bioadhesion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 1, p. 37-46, 2001.
- AGRAWAL, A. K.; GUPTA, C. M. Tuftsin-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 41, n. 2, p. 135-146, 2000.
- ALMEIDA, P. A.; DA SILVA, T. M. S.; ECHEVARRIA, A. Mesoionic 5-alkyl-1, 3-dithiolium-4-thiolates: Synthesis and brine shrimp toxicity. **Heterocyclic Communications**, v. 8, n. 6, p. 593-600, 2002.
- AMBROSI, M.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 3, n. 9, p. 1593-1608, 2005.
- ANDERSON, J. E. et al. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochemical Analysis**, v. 2, n. 3, p. 107-111, 1991.
- ANDRADE, C. A. S. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 2, p. 435-445, 2004.
- ARAÚJO, R. M. S. et al. Crataeva tapia bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, p. 20-26, 2012.
- ARAÚJO, R. M.S. et al. Lectin from Crataeva tapia bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 1, n. 2, p. 97-100, 2011.
- BARBIERI-JÚNIOR, R. C.; OSTRENSKY-NETO, A. **Camarões marinhos: reprodução, maturação e larvicultura**, v. 1, Viçosa: Aprenda Fácil, 2001. 225 p.
- BARBOSA, F. S. **Tópicos em Malacologia Médica**, 1ª ed., Rio de Janeiro: Editora da FIOCRUZ, 1995. 314 p.
- BARRETO, F. K. A. **Atividade antihiperglicêmica e antioxidante da lectina de Bryothamnion seaforthii em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina**. 2016. 68 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Médica). Departamento de Patologia e Medicina Legal. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- BASU, M. K.; LALA, S. Macrophage specific drug delivery in experimental leishmaniasis. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 681-689, 2004.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHAES, N. S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BELTRÃO, E. I. C. et al. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to mamary human tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, n.3, p. 125-134, 1998.

BENET, L. Z.; KROETZ, D. L.; SHEINER, L. B. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição e eliminação dos fármacos. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. (Eds). **As bases farmacológicas da terapêutica (Goodman & Gilman)**, 9ª ed., New York: McGraw-Hill, 1996. p. 3-20.

BEZRUKOV, V. F.; LAZARENKO, L. M. Environmental impact on age-related dynamics of karyotypical instability in plants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 520, n. 1, p. 113-118, 2002.

BIRD-LIEBERMAN, E. L. et al. Molecular imaging using fluorescent lectins permits rapid endoscopic identification of dysplasia in Barrett's esophagus. **Nature Medicine**, v. 18, n. 2, p. 315-321, 2012.

BITENCOURT, F. S. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 377, n. 2, p. 139-148, 2008.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science (New York, NY)**, v. 119, n. 3091, p. 419, 1954.

BRÜCK, A. et al. Lectin-functionalized liposomes for pulmonary drug delivery: interaction with human alveolar epithelial cells. **Journal of Drug Targeting**, v. 9, n. 4, p. 241-251, 2001.

BULL, B. S.; BRETON-GORIUS, J.; BEUTLER, E. Morphology of the erythron. In: _____. **Hematology**, 4ª ed, New York: Mc Graq-Hill, 1990. p. 297-316.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 211-214, 1999.

CAMPAROTO, M. L. et al. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 85-89, 2002.

CAPELA, F. S.; SILVA, F. **Avaliação de biomarcadores**. Departamento de Biologia, Universidade de Évora, 2001.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 5, p. 722-725, 2008.

CAVALCANTE, T. T. A. et al. Effect of lectins from *Diocleinae* subtribe against oral *Streptococci*. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3530-3543, 2011.

CHAM, B. E. Solasodine glycosides as anti-cancer agents: Pre-clinical and clinical studies. **Asia Pacific Journal of Pharmacology**, v. 9, n. 2, p. 113-118, 1994.

CHAM, B. E.; GILLIVER, M.; WILSON, L. Antitumour effects of glycoalkaloids isolated from *Solanum sodomaeum*. **Planta Medica**, v. 53, n. 1, p. 34-36, 1987.

CLELAND, J.L.; DAUGHERTY, A.; MRSNY, R. Emerging protein delivery methods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 212-219, 2001.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic? **Recent Trends in Toxicology**, v. 37, p. 47-59, 2008.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazil endemic areas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 99, supl. 1, p. 13-9. 2004.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta -General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CUATRECASAS, P.; TELL, G. P. E. Insulin-like activity of Con A and wheat germ agglutinin - direct interaction with insulin receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 2, p. 485-489, 1973.

CUNHA, A. S. **Esquistossomose mansonii**, 1ª ed, São Paulo: EDUSP; 1970.

DA COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. **Biomonitoramento de mutagênese ambiental**. Projeto Genoma do Câncer, p. 24, 2000.

DAUNTER, B.; CHAM, B. E. Solasodine glycosides. In vitro preferential cytotoxicity for human cancer cells. **Cancer Letters**, v. 55, n. 3, p. 209-220, 1990.

DORSEY, C. H. et al. Ultrastructure of the *Schistosoma mansonii* cercaria. **Micron**, v. 33, n. 3, p. 279-323, 2002.

ERDTMANN, B. Genética Toxicológica. In: ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; SILVA, J. **Genética Toxicológica**, Porto Alegre: Editora Alcance, 2003. p. 28-35.

ESTEVAM, E. C. et al. Dominant lethal effects of 2, 4-D in *Biomphalaria glabrata*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 611, n. 1, p. 83-88, 2006.

ESTEVES-SOUZA, A. et al. Cytotoxic activities against Ehrlich carcinoma and human K562 leukaemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 6, p. 838-842, 2002.

FACHINETTO, J. M. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 49-54, 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA (ANVISA, 5ª edição, volume 1) Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/cp38_2010_mono/allium_cepa.pdf> Acessado em: 19 de julho de 2016.

FEEMA. Método de determinação do efeito agudo letal causado por agents tóxicos em crustáceos da espécie *Artemia salina* – método estático. Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente, Rio de Janeiro, Brasil, MF-454 ed. 1993.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FERREIRA, R. S. et al. Crystal Structure of Crataeva tapia Bark Protein (CrataBL) and Its Effect in Human Prostate Cancer Cell Lines. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–14, 2013.

FRANCIS, F. et al. Purification of a new fungal mannose-specific lectin from *Penicillium chrysogenum* and its aphicidal properties. **Fungal Biology**, v. 115, n. 11, p. 1093-1099, 2011.

FRÉZARD, F. et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

FRÉZARD, F. Lipossomes: From Biophysics to the design of peptide vaccines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 2, p. 181-189, 1999.

FRIEDMAN, M. et al. Anticarcinogenic effects of glycoalkaloids from potatoes against human cervical, liver, lymphoma, and stomach cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 15, p. 6162-6169, 2005.

FUNASA. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 5ª ed., Brasília: Fundação Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, 2002. 842 p. v. 1.

GADANO, A. et al. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 11-16, 2002.

GONDIM, A. C. S. **Atividade antitumoral e antiviral de lectinas de leguminosas (tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae): ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL**. 2014. 135 f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Centro de Ciências. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2014.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the US Environmental Protection Agency gene-tox program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Genética Moderna**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 380p.

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 183-188, 1999.

GUPTA, H.; SHARMA, A. Recent trends in protein and peptide drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 69-75, 2009.

GUPTA, P. N.; VYAS, S. P. Investigation of lectinized liposomes as M-cell targeted carrier-adjuvant for mucosal immunization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 1, p. 118-125, 2011.

HAJTO, T.; HORVÁTH, A.; PAPP, S. Improvement of Quality of Life in Tumor Patients after an Immunomodulatory Treatment with Standardized Mistletoe Lectin and Arabinoxylan Plant Extracts. **International Journal of Neurorehabilitation**, v. 3, n. 2, 2016.

HU, K. et al. Antineoplastic agents III: steroidal glycosides from *Solanum nigrum*. **Planta Medica**, v. 65, n. 01, p. 35-38, 1999.

JUNDI, T. A. R. E.; FREITAS, T. R. O. Toxicologia Evolutiva. In: ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; SILVA, J. **Genética Toxicológica**, Porto Alegre: Editora Alcance, 2003, p.101-113.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, n. 2, p. 193-211, 1998.

KAWANO, T. Agentes que atuam sobre a morfogênese da região cefálica de alguns moluscos. **Ciência e Cultura**, p. 116-66, 1983.

KAWANO, T.; OKAZAKI, K.; RÉ, L. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)(Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a practical guide to the main stages. **Malacologia**, v. 34, n. 1-2, p. 25-32, 1992.

KAWANO, T.; SIMÕES, L. C. G. Morphogenetic effects of caffeine on *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata, Planorbidae). **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen. Series C. Biological and Medical Sciences**, v. 90, n. 3, p. 281- 302, 1987.

KELLY, C.; JEFFERIES, C.; CRYAN, S. A. Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages. **Journal of Drug Delivery**, 2011.

KLABUNDE, J. et al. *Schistosoma mansoni*: adhesion of mannan-binding lectin to surface glycoproteins of cercariae and adult worms. **Experimental Parasitology**, v. 95, n. 4, p. 231-239, 2000.

KNOLL, M. F. et al. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC.(Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 539-542, 2006.

KUMAR, K. K. et al. Biological role of lectins: a review. **Journal of Orofacial Sciences**, v. 4, n. 1, p. 20-25, 2012.

KUPCHAN, S. M. et al. Beta-solamarine: tumor inhibitor isolated from *Solanum dulcamara*. **Science**, v. 150, n. 3705, p. 1827-1828, 1965.

LARDANS, V.; DISSOUS, C. Snail control strategies for reduction of schistosomiasis transmission. **Parasitology Today**, v. 14, n. 10, p. 413-417, 1998.

LEE, K. R. et al. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2832-2839, 2004.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158-163, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998. 352 p. v. 4.

- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2002. 368 p.
- LUCENA, R. F. P. et al. Plantas Úteis da Região Nordeste Semi-árido do Brasil, Um Olhar Para a SUA Conservação e USO Sustentável. **Environmental Monitoring Avaliar**, v. 125, p. 281-290. 2007.
- LUNA, D. M. D. N. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para glicoproteínas de interesse clínico a partir de filmes mistos de fosfolipídios e lectinas depositados em substratos sólidos**. 2015. 136f. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2015.
- LUNA, J. S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.
- MA, T. H. et al. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.
- MACIEL, M. A. M. et al. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MAKHLOF, A. et al. In vitro and in vivo evaluation of WGA–carbopol modified liposomes as carriers for oral peptide delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 216-224, 2011.
- MALHEIROS, S. V. P.; MEIRELLES, N. C.; DE PAULA, E. Pathways involved in trifluoperazine-, dibucaine-and praziquantel-induced hemolysis. **Biophysical Chemistry**, v. 83, n. 2, p. 89-100, 2000.
- MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. Bench-top bioassays for the discovery of bioactivity natural products: an update. In: RAHMAN, A. U. (Ed.), **Studies in natural products chemistry**, Amsterdam: Elsevier, 1991.
- MCLAUGHLIN, J.L.; SIZARBITORI, T.C.; ANDERSON, J.E. Tres bioensayos simples para quimicos de productos naturales. **Revista de la Sociedad Venezolana Química**, v.18, p. 13-18. 1995.
- MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.
- MINKO, T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 4, p. 491-509, 2004.
- MONTGOMERY, R; CONWAY, T. W.; SPECTOR, A. A. **Bioquímica: uma abordagem dirigida por casos**, 5 ed., Artes Médicas, 1994. 277 p.
- MURPHY, P. V.; ANDRÉ, S.; GABIUS, H. J. The third dimension of reading the sugar code by lectins: design of glycoclusters with cyclic scaffolds as tools with the aim to define correlations between spatial presentation and activity. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4026-4053, 2013.
- NASCIMENTO NETO, L. G. **Efeito pró-cicatrizante do triterpeno 3β,6β,16β-Trihidroxylup-20(29)-ENE (CLF-1) isolado de folhas de Combretum leprosum e**

atividade antitumoral de uma lectina isolada da esponja marinha Haliclona caerulea. 2016. 221 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Departamento de Patologia e Medicina Legal. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2016.

NASCIMENTO, C. O. et al. Optimized extraction of a lectin from *Crataeva tapia* bark using AOT in isooctane reversed micelles. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 779-782, 2008.

NATURALISTA. Disponível em: <<http://www.naturalista.mx/taxa/83864-Crataeva-tapia>> Acessado em: 17.08.2016.

NATURDATA (Biodiversidade Online) Disponível em: <<http://naturdata.com/Allium-cepa-5353.htm>> Acessado em: 19 de julho de 2016.

NEUMANN, D. et al. Computational modeling of the sugar-lectin interaction. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 437-457, 2004.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, 10^a ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p. 194-202.

NEW, R. R. C. **Liposomes: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1990.

NOMURA, K. et al. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. **Phytochemistry**, v. 49, n.3, p. 667-673, 1998.

NUNES, N. N. S. et al. Potential of the lectin/inhibitor isolated from *Crataeva tapia* bark (CrataBL) for controlling *Callosobruchus maculatus* larva development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 48, p. 10431-10436, 2015.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNIS, R. R.; WILLARD, H.F.: **Genética Médica** (Thompson & Thompson), 6^a ed., Guanabara Koogan, 2006.

OLIVA, L. V. et al. A plant proteinase inhibitor from *Crataeva tapia* (CrataBL) attenuates elastase-induced pulmonary inflammatory, remodeling, and mechanical alterations in mice. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1958-1965, 2015.

OLIVA, L. V. et al. Effect of proteinase inhibitor from *crataeva tapia* (CrataBL) in distal lung mechanical, inflammatory and remodeling alterations induced by elastase in mice. **European Respiratory Journal**, v. 38, n. suppl 55, p. 817, 2011.

PESQUERO, N. C. et al. Determinação da constante cinética da lectina KM⁺ pelo ligante peroxidase por meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo. In: 6th Ibero-American Congress on Sensors (Ibersensor), São Paulo, 24 – 26 de novembro, 2008.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995.

PINTO, N. V. et al. Effects of *Canavalia* lectins on acute inflammation in sensitized and non-sensitized rats. **Inflammation**, v. 36, n. 3, p. 713-722, 2013.

PRATISSOLI, D. et al. Occurrence of *Ascia monuste orseis* (Lepidoptera: Pieridae) in *Crataeva tapia* seedlings. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 874-875, 2007.

PRETÉ, P. S. C. et al. Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction - A spin label study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1808, n. 1, p. 164-170, 2011.

RABELO, L. M. A. **Indução de morte celular em células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa) pela lectina da esponja *Cinachyrella apion* (CaL)**. 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Centro de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

REY, L. **Parasitologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2001.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**, 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 665-677. v. 109.

ROCHA, A. A. et al. Lectin from *Crataeva tapia* bark improves tissue damages and plasma hyperglycemia in Alloxan-induced diabetic mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

RODRIGUES, A. P. D. et al. Effect of Proteinase Inhibitor of Plant Origin *Crataeva Tapia* Bark Lectin in an Experimental Model of Chronic Allergic Pulmonary Inflammation. In: C34. New Basic Science in Asthma: Allergic Inflammation I. **American Thoracic Society**. 2015. p. A4220-A4220.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Linfócitos. **Imunologia**, 4ª ed., Editora Manole, 1997. p. 21-21. cap. 2. v.1.

ROLIM, L. A. D. M. et al. **Purificação da lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) e avaliação da genotoxicidade**. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2007.

ROLIM-SANTOS, H. M. L. et al. Cytotoxicity of doxorubicin-loaded Con A-liposomes. **Drug Development Research**, v. 67, n. 5, p. 430-437, 2006.

SALU, B. R. et al. CrataBL, a lectin and Factor Xa inhibitor, plays a role in blood coagulation and impairs thrombus formation. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 9, p. 1027-1035, 2014.

SCCNFP – The Scientific Committee on Cosmetic Products and Nonfood Products Intended for Consumers. Proposal for recommended mutagenicity/genotoxicity tests for the safety testing of cosmetic ingredients to be included in the annexes to **Council Directive 76/768/EEC**. 2003. 12 p.

SHARON, H. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 18, n. 6, p. 221-226, 1993.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, n. 4053, p. 949-959, 1972.

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

SILVA, C. H. D. **Avaliação dos mecanismos de ação da lectina de *Cratylia mollis* (Cramoll 1, 4) sobre *Leishmaniaspp***. 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2014.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 422 p.

SILVA, J.; FONSECA, M. B. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. **Genética Toxicológica**, 2003. p. 69-84.

SILVA, R. C. et al. Efeitos do oxifluorfen na fecundidade e no teor de proteínas do caramujo *Biomphalaria glabrata*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 18, p. 73-82, 2008.

SILVA, T. M. S. et al. Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp.(Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 99, n. 4, p. 419-425, 2005.

SISENANDO, H. A. A. C. **Avaliação do potencial de mutagenicidade e toxidade da lectina hipoglicemiante de folha de *Bauhinia monandra* (pata-de-vaca)**. 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2009.

SOUZA, C. P; LIMA, L. C. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil**. 1ª ed., Belo Horizonte: Editora da FIOCRUZ/CPqRR; 1990.

STEFANELLO, M. E. A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 525-530, 2006.

STORCH, J.; KLEINFELD, A. M. The lipid structure of biological membranes. **Trends in Biochemical Sciences**, v.10, n. 11, p. 418–421, 1985.

SUMNER, J. B. The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis* preliminary paper. **Journal of Biological Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 137-142, 1919.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco**. v. 2. Recife: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente, Fundação Joaquim Nabuco, Editora Massangana, 2002. p. 609-621.

TALARICO, L. F. et al. Dominant lethal effect of 60 Co gamma radiation in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation Research**, v. 561, n. 1-2, p. 139-145, 2004.

TEIXEIRA, R. O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in in vitro and in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 551-555, 2003.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 145-160, 2005.

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3 p. 131–135, 2011.

UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A. Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, 2003. p. 327-344.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

- VAN DAMMES, E. J. M. et al. Novel concepts about the role of lectins in the plant cell. **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-3**, v. 705, p. 271-294. 2011.
- VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538-1550, 2011.
- VASCONCELOS, M. A. **Atividade de lectinas e metabólitos bioativos de plantas sobre biofilmes microbianos de interesse clínico**. 2013. 265 f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Centro de Ciências. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2013.
- VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, n. 2, p. 95-111, 1995.
- VICENTINI, V. E. P. et al. Averrhoa carambola L., Syzygium cumini (L.) Skeels and Cissus sicyoides L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. **Acta Scientarium**, v. 23, n. 2, p. 593-598, 2001.
- WEIDEBORG, M. et al. Comparison of three marine screening tests and four Oslo and Paris Commission procedures to evaluate toxicity of offshore chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 384-389, 1997.
- WERLE, M.; MAKHLOF, A.; TAKEUCHI, H. Carbopol-lectin conjugate coated liposomes for oral peptide delivery. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 432-434, 2010.
- WHO (World Health Organization). **Epidemiology and control of schistosomiasis**. Technical Report Series 649, Geneva, 1980. 64 p.
- WHO (World Health Organization). International Program on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155. **Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles**, Geneva, 1993. 86 p.
- WHO (World Health Organization). **Report of informal consultation on research on the biological control of snail intermediated hosts**. (TDR/BCV-SCH/SIH/84.3), Geneve, 1984. 41 p.
- WHO (World Health Organization). **Schistosomiasis control**. Technical Report Series 515, Geneva, 1973. 48 p.
- XIMENES, N. C. A. **Purificação e caracterização da lectina da vagem de Caesalpinia ferrea (CfePL): aplicação biológica**. 2004. 60 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2004.
- YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of Allium sativum and Vicia faba. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 537, n. 1, p. 109-114, 2003.
- YU, Z. **Antimutagenic Potency of Wheat Grain and Berry Extracts in vitro and Anticarcinogenicity of Wheat Grain in vivo**. 2002. 77 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia). Oregon State University. 2002.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações**, São Carlos, 2006.

ZEIGER, E. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript. **Mutation Research**, v. 626, n. 1-2, p. 1-3, 2007.

ZHANG, F. et al. Structural studies of the interaction of Crataeva tapia bark protein with heparin and other glycosaminoglycans. **Biochemistry**, v. 52, n. 12, p. 2148-2156, 2013.

ZHANG, N. et al. Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, n. 1, p. 247-259, 2005.