

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO**

GEÓRGIA DE SOUSA FERREIRA SOARES

**ESTUDO DA QUALIDADE NUTRICIONAL DE SEMENTES E DA ATIVIDADE
ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DO *Abelmoschus esculentus* (L.)
MOENCH (QUIABO)**

**JOÃO PESSOA-PB
2010**

GEÓRGIA DE SOUSA FERREIRA SOARES

**ESTUDO DA QUALIDADE NUTRICIONAL DE SEMENTES E DA ATIVIDADE
ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DO *Abelmoschus esculentus* (L.)
MOENCH (QUIABO)**

Dissertação apresentada à Coordenação da Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientadores:

Prof.^a Dr.^a. Tatiane Santi Gadelha

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior

**JOÃO PESSOA-PB
2010**

S676e Soares, Geórgia de Sousa Ferreira.
Estudo da Qualidade Nutricional de Sementes e da
Atividade Antiinflamatória da Lectina do *Abelmoschus*
esculentus (L.) Moench (quiabo) / Geórgia de Sousa Ferreira
Soares.- João Pessoa, 2010.
115f.
Orientadores: Tatiane Santi Gadelha, José Pinto de
Siqueira Júnior,
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS
1. Nutrição. 2. *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench
(Quiabo) – Lectina - Qualidade nutricional e Antiinflamatória.

UFPB/BC

CDU: 612.39(043)

GEÓRGIA DE SOUSA FERREIRA SOARES

**ESTUDO DA QUALIDADE NUTRICIONAL DE SEMENTES E DA ATIVIDADE
ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DO *Abelmoschus esculentus* (L.)
MOENCH (QUIABO)**

Dissertação apresentada à Coordenação da Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Aprovada em: _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Tatiane Santi Gadelha DBM/CCEN/PPCN/CCS (Orientadora)
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior DBM/CCEN/PPCN/CCS (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Prof^a. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa DBM/CCEN/PPCN/CCS (Examinadora externa)
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha DBM/CCEN/PPCN/CCS (Examinador externo
– suplente)
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Prof^a. Dra. Maria José de Carvalho Costa DN/PPCN/CCS (Examinadora interna)
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Prof^a. Dra. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves – DN/PPCN/CCS (Examinadora
interna – suplente)
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

**JOÃO PESSOA-PB
2010**

RESUMO

A alimentação humana não convencional ou alternativa é composta por alimentos ou suas partes não habitualmente utilizadas, cujo valor nutritivo vem sendo avaliado ao longo dos últimos anos. Isso fez com que sementes de várias espécies vegetais tornassem recursos alternativos de proteínas e lipídeos para a alimentação humana. O isolamento e a caracterização físico-química de novas moléculas de alimentos vegetais, com vistas à sua ação fisiológica no organismo humano, utilizada como fonte potencial para o descobrimento de novas moléculas bioativas. Um grupo particular dessas moléculas, as lectinas, são proteínas de origem não imune contendo pelo menos um domínio não catalítico de ligação específica, e reversível, a carboidratos. Várias lectinas têm sido estudadas, tanto do ponto de vista de caracterização físico-química quanto biológica. Nesse contexto, o quiabo *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, (Malvaceae), hortaliça bastante difundida na região Nordeste do Brasil, além de fácil acesso e baixo custo, apresenta-se como uma fonte bastante promissora na busca por novas lectinas. Entretanto, pesquisas relativas à sua purificação e ao seu isolamento ainda são incipientes. Objetiva-se com este trabalho avaliar a qualidade nutricional das sementes do quiabo, detectar, purificar e caracterizar físico-quimicamente, avaliar o potencial fitoterápico e farmacológico (antinociceptivo, citotóxico, antiinflamatório e antifúngico) da lectina isolada de sementes de *Abelmoschus esculentus*. As sementes apresentaram uma predominância de carboidratos totais representados pelas fibras (30,81%) e carboidratos solúveis (6,69%), proteínas (22,14%) e lipídeos (14,01%). A lectina da farinha das sementes foi extraída com Tris 0,1M pH 7,4 com NaCl 0,15M. A detecção da existência de lectinas (AES) foi determinada através de ensaio de atividade hemaglutinante e revela que eritrócitos humanos B (24.00 UH.mP^{-1}), O (21.00 UH.mP^{-1}) e coelho tratado e não tratado (74.41 UH.mP^{-1}) foram aglutinados pela lectina. A lectina foi purificada por precipitação com sulfato de amônio e purificada em coluna de troca iônica. Eritrócitos de coelho foram utilizados para os testes de inibição da atividade hemaglutinante (UH) com carboidratos. Sua atividade hemaglutinante foi inibida por lactose, frutose e manose. O perfil protéico da AES analisado por PAGE-SDS demonstra que a lectina encontra-se purificada, apresentando duas bandas de massa molecular aparente entre 25 e 14 kDa. A análise por espectrometria de massa mostrou a forma monomérica com 10,29 kDa e seu dímero de 20,58 kDa. Os testes de atividade biológica da lectina de farinha de sementes previamente purificada apresentaram atividade antiinflamatória, antinociceptiva e não apresentou citotoxicidade frente a hemácias do sistema ABO. O pré-tratamento endovenoso dos animais com a AES (0,01; 0,1 e 1mg/kg), antes da administração do agente flogístico (carragenina), reduziu significativamente o edema em cerca de 15%, 21,6%, 44%. Esta inibição é dose dependente tendo seu máximo efeito na dose de 1mg/kg. A lectina de *Abelmoschus esculentus* apresenta atividade antinociceptiva no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e os extratos da semente de quiabo são capazes de reconhecer e inibir o crescimento do fungo dermatófito *Tricophyton rubrum*.

Palavras-chave: Lectina, *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, Inflamação.

ABSTRACT

The human unconventional or alternative feeding consists of foods or parts not normally used, whose nutritional value has been evaluated over the past years. This made the seeds of various plant species to become alternative sources of proteins and lipids for human consumption. The isolation and physicochemical characterization of new molecules of plant foods, with a view to their physiological action in the human body, are used as potential source for the discovery of new bioactive molecules. A particular group of these molecules, the lectins, are proteins of nonimmune origin containing at least one non-catalytic domain of specific binding, and reversible, the carbohydrates. Several lectins have been studied, both in terms of physicochemical and biological characterization. In this context, okra *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, (Malvaceae), a vegetable widespread in Northeastern Brazil, besides the easy access and low cost, seems to be a promising source in the search for new lectins. However, research on its purification and isolation are still incipient. The objective of this study was to evaluate the nutritional quality of okra seeds, and to detect, purify, and characterize the physicochemical aspects, and to evaluate the herbal and pharmacological potential (antinociceptive, cytotoxic anti-inflammatory and antifungal activity) of the isolated lectin present in *Abelmoschus esculentus* seeds. showed a predominance of total carbohydrates represented by fibers (30.81%) and soluble carbohydrates (6.69%), proteins (22.14%) and lipids (14.01%). The lectin from seed flour was extracted with 0.1 M Tris pH 7.4 with 0.15 M NaCl. The detection of the presence of lectins AES was determined by testing hemagglutination activity and human erythrocytes shows that B (24.00 UH.mP⁻¹), O (21.00 UH.mP⁻¹) and rabbits treated and untreated (74.41 UH. mP⁻¹) were agglutinated by the lectin. The lectin was purified by precipitation with ammonium sulfate and eluted in ion exchange column. Rabbit erythrocytes were selected for testing the inhibition of the hemagglutinating activity (UA) in carbohydrates. Its hemagglutinating activity was inhibited by lactose, fructose and manose. The protein profile of AES analyzed by PAGE-SDS demonstrates that the lectin is purified, presenting two bands of apparent molecular mass between 25 and 14 kDa. The analysis by mass spectrometry showed the monomeric form with 10.29 kDa and its dimer of 20.58 kDa. The biological activity tests of the lectin from AES flour previously purified presented anti-inflammatory and antinociceptive activity and showed no cytotoxicity when compared to erythrocytes from the ABO system. The intravenous pretreatment of animals with AES (0.01, 0.1 and 1 mg / kg) before the administration of the phlogistic agent (carrageenan) significantly reduced the edema by about 15%, 21.6%, 44%. This inhibition is dose dependent with maximum effect at 1mg/kg. The lectin from *Abelmoschus esculentus* shows antinociceptive activity in writhing test induced by acetic acid and the okra seed extracts are able to recognize and inhibit the growth of the dermatophyte *Tricophyton rubrum* fungus.

Keywords: Lectin, *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

APÊNDICE A

Figure 1. Chromatogram of Okra seed oil obtained by GC-MS. (Only major components are shown).....	71
Figure 2. Spectrum in the infrared region (IR) of Okra seed oil.....	72
Figure 3. H1356 NMR Spectrum of Okra seed oil.....	73
Figure 4. (A) Complete PDSC curve of Okra seed oil, (B) first peak of the PDSC curve showing OT and Tp.....	74
Figure 5. Autoxidation mechanism of lipids.....	75

APÊNDICE B

Figure 1. Ion-exchange chromatography obtained from fraction 30/60 the lectin from <i>Abelmoschus esculentus</i> seeds.....	99
Figure 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in presence of 2-mercaptoethanol of purified lectin from <i>Abelmoschus esculentus</i>	100
Figure 3. Hybrid quadrupole/Ion Mobility separator/orthogonal acceleration mass spectra.....	101
Figure 4a and b. Inhibition of edema by lectin seed of <i>Abelmoschus esculentus</i> paw induced by carrageenin in rats.....	104
Figure 5a e b. The lectin Okra does not inhibit the paw edema induced by dextran in rats.....	105
Figure 6. Antinociceptive effect of lectin <i>Abelmochus esculentus</i> intravenously in the writhing test induced by acetic acid.....	106

APÊNDICE C

Figura 1. Composição centesimal de folhas liofilizadas, folhas <i>in natura</i> e da farinha de sementes.....	108
Figura 2. Curva de calibração com Albumina Sérica Bovina (BSA) para dosagem de proteínas solúveis.....	109
Figura 3. Curva de absorvância a 595nm em diversas concentrações de proteínas solúveis das folhas liofilizadas em diferentes extratos.....	109
Figura 4. Curva de absorvância a 595nm em diversas concentrações de proteínas solúveis da farinha das sementes em diferentes extratos.....	110
Figura 5. Concentração de proteínas solúveis das folhas liofilizadas e da farinha das sementes em diferentes extratos (obtido com a aplicação da equação da curva de calibração com BSA, Fig 1).....	110

LISTA DE TABELAS

APÊNDICE A

Table 1. Proximate composition (g/100 g) of seed and total caloric value (kcal/100 g) of Okra seed (<i>Abelmoschus esculentus</i> (L) Moench).....	68
Table 2. Percentage composition of fatty chains present in Okra seed oil.....	69
Table 3. Signals of the Okra seed oil spectrum. The hydrogens were classified according to the displacement.....	70

APÊNDICE B

Table 1. Hemagglutinating activity of <i>Abelmoschus esculentus</i> lectin against rabbit and human erythrocytes.....	102
Table 2. Influence of carbohydrate on the hemagglutinating activity of <i>Abelmoschus esculentus</i> lectin.....	103

APÊNDICE C

Tabela 1. Teor de proteínas solúveis e atividade hemaglutinante da farinha de semente de <i>Abelmoschus esculentus</i>	111
Tabela 2. Teor de proteínas solúveis e atividade hemaglutinante da farinha da folha de <i>Abelmoschus esculentus</i>	111

LISTA DE SIGLAS

AES	Lectinas de <i>Abelmoschus esculentus</i>
UH	Atividade Hemaglutinante
IAL	Instituto Adolfo Lutz
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Pressure</i>
ISCB	Instituto de Ciências Biomédicas (ISCB)
PAGE	<i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SNC	Sistema Nervoso Central
TRIS	Tris-hidroxiaminometano
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
TOF	<i>Time of Flight</i>
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

LISTA DE ABREVIATURAS

Con A	<i>Concanavalina A</i>
e.v	endovenoso
s.c	subcutânea

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau centígrado
kDa	KiloDalton
m/v	Relação massa/volume
Mg/Kg	Miligrama por quilo de peso
mgP/gF	Miligrama de proteína por grama de farinha
M	Concentração de solução expressa em Molaridade (molar)
mM	Concentração da solução expressa em milemolar
rpm	Rotação por minuto
UH/mgP	Atividade Hemaglutinante por miligrama de proteína
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 Lectinas.....	20
2.1.1 Classificação das Lectinas Vegetais.....	21
2.1.2 Ocorrência na Natureza, Funções e Aplicabilidade.....	22
2.1.3 Atividade Antinutricional.....	23
2.2 Atividade Biológica.....	25
2.2.1 O Processo Inflamatório.....	25
2.2.2 Fisiologia da Dor e da Nocicepção.....	27
2.3 Atividade Antifúngica.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Material Vegetal.....	29
3.1.1 Identificação Botânica.....	29
3.2 Animais de Experimentação.....	29
3.3 Drogas e Soluções Usadas.....	30
3.4 Preparo da Farinha de Sementes de <i>Abelmoschus esculentus</i>.....	30
3.5 Análise da Composição Centesimal.....	30
3.6 Extração de Proteínas Solúveis das Amostras.....	31
3.7 Precipitação por Sulfato de Amônio.....	31
3.8 Determinação da Atividade Hemaglutinante.....	31
3.9 Determinação do Teor de Proteínas Solúveis.....	31
3.10 Especificidade por Açúcares.....	32
3.11 Detecção de Saponinas.....	32
3.12 Precipitação por Sulfato de Amônio.....	32

3.13 Cromatografias.....	33
3.13.1 Cromatografia de Troca Iônica.....	33
3.13.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e β - mercaptoetanol.....	33
3.14 Determinação da Massa Molecular por Espectrometria de Massa da Lectina da fração 30-60 de Sementes de <i>Abelmoschus esculentus</i>.....	33
3.15 Atividade Hemolítica (Citotoxicidade).....	34
3.16 Estudo da Atividade Antiinflamatória em Modelo de Edema de Pata.....	34
3.16.1 Avaliação das Atividades Antiedematogênica.....	34
3.17 Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético.....	35
3.18 Atividade Biológica em Fungos Dermatófitos.....	35
3.18.1 Concentração de Lectinas.....	35
3.18.2 Ensaio da Atividade Antifúngica.....	35
3.19 Análise Estatística.....	36
REFERÊNCIAS.....	37
APÊNDICE A - Chemical composition of seed, spectroscopic and thermo-oxidative analysis of Okra oil).....	47
APÊNDICE B - Purification, toxic, anti edematogenic and antinociceptive effects of <i>Abelmoschus esculentus</i> seeds lectin).....	48
APÊNDICE C - Resultados obtidos da Folha e sementes de <i>Abelmoschus esculentus</i>; Resumo enviado para Congresso- SBBq.....	49
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	50

1 INTRODUÇÃO

Alimentação não convencional ou alternativa é aquela composta por alimentos ou partes de alimentos não habituais que, utilizados por razões fisiológicas, sociais e econômicas, são capazes de manter a saúde de quem os utiliza cujo valor nutritivo vem sendo avaliado ao longo dos últimos anos (SILVA, 2004).

O uso de vegetais como fonte para a produção de medicamentos tem se difundido largamente nos últimos anos e vem sendo empregado no tratamento de muitas doenças, na forma de medicamentos fitoterápicos (MELLO, 2005). Por esta razão, existe um interesse crescente no estudo da composição desses vegetais, tanto para seus constituintes orgânicos como para inorgânicos (LOPES *et al.*, 2005; GOMEZ, 2004). Além dos componentes orgânicos que apresentam propriedades medicinais, alguns macro e micronutrientes de origem vegetal são de grande relevância na alimentação humana e animal (NAPPI; VASS, 2002).

O desenvolvimento tecnológico e científico tem permitido avaliar o valor nutritivo de diversas plantas alimentícias que são aquelas que possuem uma ou mais partes ou produtos que podem ser utilizados na alimentação humana, tais como: raízes, tubérculos, bulbos, talos, folhas, frutos e sementes (KINUPP, 2007). Isso fez com que sementes de várias espécies vegetais se tornassem recursos alternativos de proteínas para a alimentação humana (DEL-VECHIO *et al.*, 2005). Na grande biodiversidade brasileira de plantas, destaca-se um número significativo de espécies utilizadas na nossa alimentação e eventualmente também com fins terapêuticos e medicinais (DEL-VECHIO *et al.*, 2005).

Dentre os vegetais utilizados na nossa alimentação, menciona-se o quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) originário da Etiópia-África, pertencente à família Malvaceae, hortaliça bastante difundida na região Nordeste do Brasil, porém pouco utilizada no restante do país. Apresenta frutos do tipo cápsula, com muitas sementes, alongados e de coloração escura. É uma olerícola de ciclo vegetativo rápido, de fácil cultivo e alta rentabilidade (COSTA; OLIVEIRA; HAAG, 1981), apresentando produção de 10 a 20 toneladas por hectare (AGRUJURIS, 2004).

O isolamento e a caracterização físico-química de novas moléculas de alimentos vegetais, com vistas à sua ação fisiológica no organismo humano, é uma tecnologia inovadora utilizada como fonte potencial para o desenvolvimento de medicamentos mais efetivos (NASCIMENTO *et al.*, 2000). Dentre essas biomoléculas, podemos destacar as lectinas, que são proteínas de origem não imune contendo pelo menos um domínio não catalítico de ligação específica, reversível, a carboidratos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Um número

relativamente grande de lectinas de leguminosas tem sido isolado, purificado e estudado, quanto às suas ações biológicas (SHARON; LIS, 2003). Estas lectinas são encontradas principalmente em sementes, e em menor extensão em caule e folhas (SHARON; LIS, 2003; LORIS, 2002).

No entanto, as pesquisas relativas à purificação e ao isolamento da lectina do quiabo ainda são incipientes, apesar dessa hortaliça constituir-se uma promissora fonte de lectinas, o que faz desse trabalho um marco no desenvolvimento de tecnologia e agregação de valor nutricional a esses produtos.

Objetiva-se, com este trabalho, avaliar a qualidade nutricional das sementes *Abelmoschus esculentus* (quiabo), assim como detectar, purificar e caracterizar físico-quimicamente, avaliar o potencial fitoterápico e farmacológico (antinocicepivo, citotóxico, antiinflamatório e antifúngico) da lectina isolada de suas sementes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Lectinas

Carboidratos atuam como intermediários na comunicação celular em inúmeros sistemas biológicos, podendo assim, influenciar diversos fenômenos de diferenciação, proliferação e interações entre células em condições fisiológicas e patológicas. As informações presentes na estrutura dos oligossacarídeos conjugados a proteínas ou lipídios na superfície das células são reconhecidas por um grupo especializado de proteínas, as lectinas (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

Lectinas são um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas, de origem não imune, que apresentam a propriedade de ligar-se a carboidratos com alta especificidade. As mesmas são largamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em animais, plantas e microrganismos. Nos animais e microrganismos podem servir para mediar o reconhecimento biológico em diversos eventos relacionados à comunicação celular, desenvolvimento, defesa, metástase tumoral, inflamação (CAVADA *et al.*, 2001).

Apesar da sua abundância em muitas plantas, as lectinas não possuem uma função fisiológica especificamente definida. Entre algumas funções propostas para as lectinas de plantas destacam-se: armazenamento ou transporte de carboidratos em sementes, inibição de crescimento em fungo (SHARON; LIZ, 2003) ou atividade inseticida (TRIGUEIROS *et al.*, 2003).

As especificidades das lectinas aos diferentes tipos de carboidratos possibilitam a sua utilização em várias pesquisas nas áreas biológicas e médicas, podendo ser utilizados em vários processos, tais como a purificação à caracterização de polissacarídeo ou glicoconjugados, caracterização de grupos sanguíneos, identificação de células malignas, diferenciação de células patogênicas e caracterização dos estágios de desenvolvimento de microrganismos (MATSUI *et al.*, 2001). Lectinas de plantas apresentam diferenças nas suas estruturas moleculares e propriedades bioquímicas, assim como uma ampla variedade de especificidade de ligação a carboidratos (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997; WITITSUWANNAKUL; WITITSUWANNAKUL; SAKULBORIRUG, 1998).

Originalmente, lectinas eram consideradas “substâncias semelhantes a anticorpos”. Este termo se refere à aparente especificidade de ligação e não à similaridade estrutural (RÜDIGER; GABIUS, 2001). A abordagem que é dada quanto à origem não imune das lectinas serve para diferenciá-las de anticorpos, anticarboidratos que aglutinam células.

Enquanto os anticorpos são estruturalmente similares, as lectinas diferem entre si quanto à composição de aminoácidos, requerimentos de metais, peso molecular e estrutura tridimensional. Além disso, as lectinas não são apenas encontradas em animais, mas também em outros organismos que não possuem sistema imune, como plantas e bactérias (MOREIRA *et al.*, 1998).

O estudo das lectinas, que possuem característica específica de ligar-se a carboidrato, possibilitou a caracterização estrutural das mesmas e o desenvolvimento de novas técnicas, em particular a cristalografia de alta resolução por raios-X, que permite identificar os grupos químicos envolvidos e a forma como os carboidratos interagem com a lectina (EVERTS, VILLMANN; HOLLMANN, 1997).

2.1.1 Classificação das Lectinas Vegetais

As lectinas vegetais representam um grupo estruturalmente heterogêneo. Podendo diferir em vários aspectos, tais como: composição de aminoácidos, massa molecular aparente, estrutura e número de subunidades, estrutura terciária, o que está diretamente relacionado com a especificidade por monossacarídeos e com a sua atuação biológica (SILVA, 2008).

Peumans e Van Damme (1995), fundamentados na estrutura geral das lectinas, dividiram-nas em: Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas.

- Merolectinas – São proteínas de pequeno tamanho e que possuem apenas um domínio ligante de carboidrato, podem ligar-se a células, produzindo modificações fisiológicas, sem, no entanto, precipitar glicoconjugados ou aglutinar células;
- Hololectinas – Possuem, no mínimo, dois domínios idênticos ou bastante homólogos que se ligam ao mesmo carboidrato ou a açúcares de estrutura semelhante. As hololectinas são usualmente designadas como moléculas di ou multivalentes, capazes de promover a aglutinação de células e/ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas vegetais conhecidas são hololectinas, porque elas se comportam como hemaglutininas;
- Quimerolectinas – São proteínas quiméricas consistindo de um ou mais domínios de ligação a carboidrato e de um domínio não relacionado à ligação com carboidrato que possui uma atividade enzimática bem definida e outra atividade biológica que deve agir independente do domínio de ligação a carboidrato (PEUMANS *et al.*, 2000);

- Superlectinas – São proteínas constituídas exclusivamente de dois ou mais domínios de ligação a carboidratos que reconhecem estruturalmente açúcares não relacionados.

2.1.2 Ocorrência na Natureza, Funções e Aplicabilidade

Lectinas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em microorganismos, animais e plantas. Nas plantas, as lectinas estão presentes em todos os tecidos. A maioria das lectinas têm sido purificadas e caracterizadas a partir de sementes de leguminosas, representando cerca de 10% do conteúdo de proteína total, embora várias lectinas também sejam isoladas da família das Moraceae (MOREIRA *et al.*, 1998). Várias lectinas foram isoladas de raízes e entrecasca, frutos (PEUMANS *et al.*, 2000), bulbos (MO *et al.*, 1994), rizomas (PEUMANS *et al.*, 2000), folhas (RATANAPO, NGAMJUNYAPORN; CHULAVATNATOL, 2001) e tubérculos (ALLEN *et al.*, 1996; ASHFORD, ALLEN; NEUBERGER, 1982).

As lectinas estão possivelmente envolvidas nos processos, tais como: transporte de carboidratos, alongamento da parede celular, interações célula-célula, regulação do crescimento, reconhecimento dos receptores nas membranas, ou para funcionar como enzimas ou proteínas de armazenamento (PUSZTAI, 2000), reconhecimento e/ou ligação de bactéria simbiótica a raízes de leguminosas e para a defesa de plantas contra bactérias e fungos. (VAN RHIJN; GOLDBERG; HIRSCH, 1998).

Lectinas vêm sendo utilizadas, de maneira satisfatória, em diversas pesquisas. Entre a larga gama destas biomoléculas, cujas atividades biológicas têm sido estudadas e evidenciadas, destacam-se: as lectinas de sementes de *Dioclea violacea* e de *Dioclea grandiflora*, capazes de causar apoptose de células T e inflamação em ratos (BARBOSA *et al.*, 2001); a lectina de *Erythrina cristagalli*, mitogênica para linfócitos humanos (TURTON *et al.*, 2004), além de apresentar estimulação de macrófagos, liberação de peróxido de hidrogênio e indução de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001); atividade analgésica; efeitos insulino-miméticos (CAVADA *et al.*, 2001) e indução de óxido nítrico em aorta de rato (GADELHA *et al.*, 2005).

É de grande importância mencionar, que a partir do isolamento de Con A (*Canavalia ensiformis*), várias outras lectinas com propriedades físicas similares têm sido purificadas e parcialmente caracterizadas de outras espécies da subtribo Diocleinae, como as lectinas de *Canavalia brasiliensis*, ConBr (MOREIRA; CAVADA, 1984), *Canavalia bonariensis*,

CABO (CAVADA *et al.*, 1996), *Cratylia floribunda*, CFL (OLIVEIRA, CAVADA; MOREIRA, 1991), *Dioclea guianensis*, DGuIL (VASCONCELOS *et al.*, 1991), *Dioclea violacea*, DVioL (MOREIRA *et al.*, 1996).

Várias evidências têm demonstrado que, apesar de terem alta homologia, a Con A e outras lectinas desta mesma subtribo apresentam diferenças nas suas atividades biológicas (CAVADA *et al.*, 2001) no que se refere à capacidade de: estimular a proliferação de linfócitos e produção de interferon- γ (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992), estimular macrófagos peritoneais e reações de inflamação (RODRIGUEZ *et al.*, 1992), induzir edema de pata em ratos e migração de células peritoneais (BENTO *et al.*, 1993).

Uma das aplicabilidades de grande relevância às lectinas como ferramentas valiosas em imunologia é a capacidade de estimular resposta mitogênica em linfócitos humanos. Essa propriedade foi descoberta em 1960, por Nowell, avaliando o efeito da PHA sobre linfócitos humanos (NOMURA *et al.*, 1998; JANEWAY *et al.*, 2000). Outras lectinas com atividade mitogênica foram identificadas, destacando-se a Con A, a lectina de *Ulex europeus*, a de *Vicia faba*, a “pokeweed mitogen”, PWM (JANEWAY *et al.*, 2000). A resposta ao estímulo de linfócitos com Con A inclui também o aumento da expressão de receptores de citocinas (IL-2) na superfície linfocitária, favorecendo ainda mais o processo de ativação celular (JANEWAY *et al.*, 2000). Galectina-3, uma proteína ligante a galactosídeos, mostrou-se capaz de ativar linfócitos através da interação com glicoconjugados da superfície celular, sendo assim conhecida como mitógeno.

Nos dias atuais, as lectinas são responsáveis como determinantes no reconhecimento em diversos processos biológicos, como a retirada de glicoproteínas a partir do sistema circulatório, recrutamento de leucócitos aos sítios inflamatórios, controle do tráfego intracelular de glicoproteínas, adesão de agentes infecciosos às células hospedeiras, (SHARON; LIS, 2003), bem como interações no sistema imune, a saber: estimulação mitogênica e produção de interferon sobre linfócitos humanos (MOREIRA *et al.*, 1998; YE; NG, 2001), atividade inibitória da transcriptase reversa do HIV-1 e estimulação da produção de nitrito por macrófagos peritoneais murinos (YE; NG, 2001).

2.1.3 Atividade Antinutricional

As plantas, além de apresentarem compostos com alto potencial nutricional, também apresentam compostos antinutricionais. Os fatores antinutricionais presentes em alimentos são

substâncias químicas que, embora não tóxicas, podem provocar efeitos fisiológicos adversos ou diminuir a biodisponibilidade de nutrientes (ANTUNES; SGARBIERI, 1980).

A relevância dos fatores antinutricionais sobre os riscos à saúde provocados por estes antinutrientes é o desconhecimento dos níveis de tolerância, do grau de variação do risco individual e da influência de fatores ambientais sobre a capacidade de detoxificação do organismo humano. Os fatores antinutricionais são inativados ou destruídos pelo calor, em maior ou menor extensão, em função da intensidade e duração do tratamento térmico. A destruição térmica total dos antinutricionais aumenta o dano às proteínas da dieta, atuando na diminuição da digestibilidade, bem como diminuição da utilização metabólica. (ANTUNES; SGARBIERI, 1980).

Os fatores antinutricionais incluem os inibidores de protease, hemaglutinininas (lectinas), taninos, fitatos, saponinas. A propriedade antinutricional das lectinas é atribuída ao fato destas proteínas ligarem-se aos açúcares presentes nas membranas celulares promovendo sua aglutinação (LIZ; SHARON, 1998).

As hemaglutinininas, também chamadas de lectinas e fitohemaglutinininas, são glicoproteínas que se ligam a sacarídeos ou proteínas contendo sacarídeos de modo altamente específico; sua ação potencializa a hemaglutinação, interfere na digestão e absorção e proporciona a hidrólise de proteínas (SGARBIERI; WHITAKER, 1982).

O fato das lectinas reconhecerem e ligarem-se a receptores glicosilados presentes nas células intestinais confere a estas proteínas propriedades negativas interferindo nos processos de digestão, absorção e utilização de nutrientes, devido à paralisação do transporte desses nutrientes e à absorção de substâncias nocivas. Entretanto, o exato mecanismo de ação das lectinas ainda não está totalmente esclarecido (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004).

A diminuição da absorção de nutrientes, com conseqüente perda de proteínas e outros materiais celulares de origem endógena, acarreta uma rápida perda de peso e inibição do crescimento de animais experimentais (SGARBIERI, 1989). Além dos efeitos degenerativos nas membranas celulares, as lectinas possuem a capacidade de inibir várias enzimas intestinais, por possuírem uma certa especificidade por células da mucosa do intestino (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004).

A partir da absorção por células da mucosa do intestino, seja por endocitose e posterior exocitose de lectinas, a mesma sendo liberada na corrente sanguínea, acarretam-se efeitos deletérios sistêmicos acometendo vários órgãos e tecidos (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004).

Os possíveis efeitos adversos de lectinas em humanos não estão claramente definidos, no entanto, podem ser constatados em experimentos *in vitro*. Sob este aspecto, as alterações observadas no intestino e em outros órgãos de camundongos, ratos e porcos demonstram que as lectinas são capazes de provocar reações específicas importantes sob o aspecto de segurança alimentar (PEUMANS; VAM DAMME, 1995).

2.2 Atividade Biológica

2.2.1 O Processo Inflamatório

A inflamação é a reação do tecido vivo vascularizado à lesão local, causada por infecções bacterianas, agentes físicos, substâncias químicas, tecido necrótico e por reações imunológicas. O papel da inflamação é conter e isolar a lesão, destruir os microrganismos invasores, inativar as toxinas e atingir a cura e o reparo. Entretanto, a inflamação e o reparo são potencialmente nocivos, provocando reações de hipersensibilidade potencialmente fatais, lesão progressiva do órgão e fibrose. O processo inflamatório pode ser dividido em uma fase aguda e uma fase crônica (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Os sinais clássicos da inflamação aguda compreendem calor, vermelhidão, edema (tumor), dor, entre outros; sendo dividida em uma fase aguda e uma fase crônica. Seus principais efeitos na fase aguda destacam-se a vasoconstrição inicial transitória das arteríolas, a seguir, vasodilatação, provocando aumento de fluxo; responsável pelo calor e pelo rubor, menor velocidade de circulação devido à permeabilidade vascular aumentada, leva a êxtase. A permeabilidade aumentada é a causa do edema, com a menor velocidade, surge marginação dos leucócitos, precedendo os eventos celulares (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Já na fase crônica a inflamação é definida como sendo de duração prolongada, em que ativa a destruição tecidual e as tentativas de cicatrização ocorrem de forma simultânea. Essas inflamações podem surgir de várias maneiras, podendo ocorrer após a persistência do estímulo desencadeador, devido a alguma interferência no processo normal de cicatrização; ou pode ser resultado de surtos repetidos de inflamação aguda; que começa de forma insidiosa como uma resposta indolente de baixa intensidade que não segue a inflamação aguda clássica. (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Os achados histológicos da inflamação crônica incluem: Infiltração por células mononucleares, principalmente macrófagos, linfócitos e plasmócitos; destruição tecidual;

reposição do tecido conjuntivo da lesão por um processo envolvendo proliferação dos vasos sanguíneos e fibrose (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Os mediadores químicos podem originar-se do plasma, das células ou do tecido agredido e podem ser divididos em grupos, tais como: aminas vasoativas: histamina e serotonina; proteases plasmáticas: sistemas calicreína, complemento (C3a, C5a, C5b-C9), coagulação fibrinolítico; metabólitos do sistema araquidônico: via ciclooxigenase e lipooxigenase; constituintes lisossômicos, radicais livres derivados de oxigênio, fatores ativadores de plaquetas, citocininas e fatores de crescimento (CONTRAN *et al.*, 2000).

Em modelos experimentais, para indução de inflamação, uma das formas utilizadas é através da inoculação de dois agentes flogísticos, tais como carragenina ou dextrana (HONMURA *et al.*, 1999).

A carragenina, obtida a partir do isolamento da alga *Chondrus crispus*, é utilizada como agente edematogênico. Um modelo convencional de inflamação aguda é o edema de pata induzido pela administração intraplantar de carragenina (KALE *et al.*, 2007). A carragenina, desde a década de 60, tem sido utilizada como agente inflamatório, por ser um composto que induz uma reação inflamatória aguda envolvendo uma liberação de mediadores que possibilitam mudanças na permeabilidade vascular e formação de edema (DI ROSA, 1972).

A dextrana, por sua vez, foi biossintetizado a partir *Leuconostoc mesenteroides*, constituída por unidades de D-glicose unidas por ligações alfa (1-6) (GARCIA-CRUZ, 2001).

Inúmeros são os métodos para avaliar um processo inflamatório, ressalta-se, dentre estes métodos, estudos de edema medidos através de hidroplesitimografia, nos quais o volume do edema é calculado pela diferença do volume inicial e final, contagem total e diferencial de células inflamatórias, histopatologicamente, aferição da temperatura, medição do fluxo sanguíneo, entre outros (GREGORINI, 2000).

Devido à larga gama de espécies vegetais apresentando propriedades antiinflamatórias, as lectinas possuem um grande potencial para o desenvolvimento de certos fármacos, com ação inflamatória que possam ser passíveis de utilização na saúde humana. (MAZUMDER *et al.*, 2003).

2.2.2 Fisiologia da Dor e da Nocicepção

Segundo o dicionário Webster (2009), dor é a sensação que temos quando ficamos feridos mental ou fisicamente, com pena, sofrimento, grande ansiedade, angústia. Além disso, o Webster oferece outra definição da dor, como uma sensação de grande desconforto, prejuízo em algumas partes do corpo, causada pela injúria, doença ou transtorno funcional, que é transmitido através do sistema nervoso; todo o estímulo de intensidade suficiente para ameaçar o bem-estar dos tecidos, e que dá lugar à dor, é chamado noxa ou estímulo nocivo, o qual evoca movimentos reflexos característicos que são de natureza protetora e defensiva.

Define-se o termo nocicepção como um processo de detecção e sinalização da presença de um agente nocivo. Mediante um estímulo doloroso, mecânico ou térmico, ativam-se os nociceptores na região atingida, os quais enviam a informação ao cérebro através das fibras C aferentes. Essa dor, que é denominada fisiológica e que tem por objetivo informar ao corpo acerca de um perigo, desencadeia um conjunto de fenômenos, entre os quais se encontra o reflexo de retirada (proteção) (ARRUDA, 2008).

Em animais, o teste de contorções abdominais, induzido por ácido acético, é considerado um teste nociceptivo periférico; o mesmo tem pouca especificidade, uma vez que drogas hipotensoras e anti-depressoras do Sistema Nervoso Central (SNC) podem inibir essas contorções (PETTIBONE, 1989). Este teste é realizado em ratos ou camundongos mediante a injeção intraperitoneal de substâncias que causam irritação como o ácido acético. Este agente faz com que ocorra a síntese endógena de prostaglandina E_2 , prostaglandina $F_{2\alpha}$, bradicinina, fator de necrose tumoral α_1 , interleucina 1β e interleucina 8 (RIBEIRO; SCHIMIDT, 2000).

2.3 Atividade Antifúngica

Com o aumento progressivo de doenças causadas por dermatófitos em seres humanos, tornou-se mais evidente a carência de estudos e a necessidade da adoção de novas técnicas de prevenção, objetivando minimizar a ação desses patógenos. A evolução terapêutica dos últimos anos, com o surgimento de drogas para uso tópico, oral e/ou parenteral, como a amorolfina, ciclopirox, itraconazol, terbinafina, fluconazol, dentre outras, tem permitido índices de cura altos, menor tempo de tratamento e maior segurança para os pacientes, em comparação com as drogas anti-fúngicas disponíveis antes da década de 90, a griseofulvina e o cetoconazol. Tanto as medicações de introdução mais recente no arsenal terapêutico quanto as mais antigas devem ser prescritas e ter seu uso sempre acompanhado por dermatologista, já

que todas podem provocar efeitos adversos e interações medicamentosas mais ou menos graves (RAMOS-e-SILVA, 2000).

Os dermatófitos são um grupo de fungos relacionados que têm a habilidade para invadir tecido e queratina (pele, cabelos e unhas) e produzem uma infecção, dermatofitose. Dermatófitos estão entre os parasitas mais comuns observados na pele de humanos e animais. Infecções são geralmente cutâneas e restringidas às camadas superficiais da pele. A infecção por dermatófitos pode ser de moderada a severa como consequência das reações do hospedeiro contra os produtos metabólicos do fungo, virulência, o local anatômico da infecção, e fatores ambientais locais (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

De acordo com Organização Mundial de Saúde, as dermatomicoses têm frequência alta na população com uma incidência ao redor 20%, adequadamente com a Organização Mundial de Saúde (MARQUES *et al.*, 2000). Atualmente, as onicomicoses podem ser observadas em mais de 10% da população humana (KORTING; SCHALLER, 2001).

Os fungos apresentam na sua parede celular uma substância quitinosa formada por açúcares do tipo N-acetilglicosamina. Interações de lectinas de plantas com fungos têm sido demonstradas através da capacidade da lectina de *Urtica dioica*, com especificidade para quitina, inibir o crescimento de alguns fungos fitopatogênicos (BROEKAERT *et al.*, 1989).

A heveína, uma proteína do látex de *H. brasiliensis*, é um outro exemplo de proteína ligante de quitina que apresenta propriedades antifúngicas (VAN PARIJS *et al.*, 1991). A lectina Concanavalina A e a lectina de *Agaricus biporus*, quando testadas com este fungo, apresentaram atividade hemaglutinante. A suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae* é apropriada não somente para a investigação da lectina em essência, mas também para monitorar a variação da atividade lectínica de isolados de fungos na presença de planta hospedeira latente durante a síntese de micorriza (BUSCH; LELLEY, 2000). A presença de ácido siálico na superfície celular de dois isolados de *Candida albicans* foi identificada e a sua distribuição na superfície íntegra de *C. albicans* foi inferida por marcação com *Limulus polyphemus* fluoresceína e aglutinina de *Limax flavus* e observada por microscopia ótica com aglutinina de *Sambucus nigra* FITC e anulada por tratamento prévio da levedura com sialidase bacteriana. O ácido siálico contribui também para a eletronegatividade de *C. albicans*, um fator decisivo na interação fúngica *in vivo*. (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

No presente estudo foram utilizadas sementes de *Abelmoschus esculentus*, popularmente conhecido como quiabo, coletadas nos meses de maio a setembro no município do Conde - Paraíba, e transportada até a feira agro-ecológica realizada na Universidade Federal da Paraíba para realização das análises.

3.1.1 Identificação Botânica

Para preparo das exsiccatas, as folhas, galhos e frutos foram tratados, prensados e secos, acondicionados em folhas de jornal. A temperatura aplicada para secagem foi de, aproximadamente, 38°C, por um período de 48 horas. Em seguida, as exsiccatas foram enviadas ao Herbário da UFPB, que efetuou a caracterização botânica da espécie com base nas características físicas do material coletado. De acordo com a caracterização botânica, a espécie de Quiabo estudado foi identificada pela Prof^ª. Dr^ª. Rita Baltazar de Lima, do Departamento de Botânica da UFPB, juntamente com a Bolsista PIBIC Cíntia Menezes Lima Ramos Araújo, como pertencente à família Malvaceae, cujo nome científico é *Abelmoschus esculentus*, conforme características do material coletado. A exsicata encontra-se depositada no Herbário da UFPB sob nº JPB 41386 da Universidade Federal da Paraíba

3.2 Animais de Experimentação

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas (*Rattus norvegicus*) com peso entre 150 e 250g e camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) com peso entre 25 a 35 g provindos do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos na sala de quarentena do Instituto de Ciências Biomédicas (ISCB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) nos dias antecedentes ao experimento, recebendo água e ração *ad libitum*, sob condições adequadas de luz e temperatura. Esses animais permaneceram no laboratório durante um período de adaptação de, pelo menos, uma hora antes dos testes e foram manipulados de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo Comitê de Ética da UECE. Os experimentos foram realizados entre 7 e 16h, à temperatura de 20±3°C.

3.3 Drogas e Soluções Usadas

As seguintes substâncias foram utilizadas:

- Ácido acético glacial, formaldeído 37%, da Merck;
- Carragenina- λ - Sigma Chemical;
- Dextrana - Sigma Chemical;
- Indometacina – Prodome Química e Farmacêutica.

Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso em solução salina. Todos os sais e drogas utilizados foram de pureza analítica.

Acrilamida, bisacrilamida, albumina sérica bovina, Comassie Brilhante Blue G e R, enzimas proteolíticas (Tripsina, papaína, bromelaína), carboidratos simples, proteínas padrões de eletroforese (marcadores) de 12 à 130Kda foram obtidos da Sigma Chemical Co., St.Louis, USA. Beta-mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio (SDS), Sigma Chemical Co., St.Louis, USA. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.4 Preparo da Farinha de Sementes de *Abelmoschus esculentus*

As sementes foram trituradas em moinho elétrico do tipo Willey para obtenção de uma farinha fina. O material obtido foi delipidado por lavagens sucessivas com hexano e seco ao ar livre e, em seguida, estocado em frascos hermeticamente fechados até a utilização.

3.5 Análise da Composição Centesimal

Após seleção macroscópica de sementes em condições apropriadas para obtenção da farinha e posteriores análises, determinaram-se os teores de umidade, cinzas, lipídeos e proteína seguindo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005), enquanto que o teor de fibras e carboidratos foi determinado segundo o método Antrona descrito (YEMN; WILLIS, 1954).

3.6 Extração de Proteínas Solúveis das Amostras

A farinha obtida a partir da trituração das sementes de *Abelmoschus esculentus* foram submetidas à extração com várias soluções de tampão em diversos valores de pH, sob agitação constante, durante 3 horas à temperatura de 25°C. A suspensão obtida foi centrifugada a 5.000rpm a 4°C por 20 minutos, o precipitado foi descartado. O sobrenadante, denominado de extrato total, foi filtrado e utilizado para análises posteriores.

3.7 Precipitação por Sulfato de Amônio

O extrato total de sementes de *Abelmoschus esculentus* obtido a partir Tris-HCl 0,1M pH 7,4; com NaCl 0,15M foi submetido à precipitação com sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, empregando-se 3 intervalos de saturação: 0-30% (m/v), 30-60% (m/v), 60-90% (m/v), de acordo com Scopes (1994). A cada saturação com sulfato de amônio a solução foi deixada em descanso por uma noite, centrifugada a 5.000 rpm a 4°C por 20 minutos. O precipitado de cada intervalo foi dialisado exaustivamente e liofilizado. As frações obtidas foram submetidas à atividade hemaglutinante e a fração 30-60% foi submetida à cromatografia de troca iônica.

3.8 Determinação da Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante dos diferentes extratos protéicos foram determinadas por meio de diluições dupla-seriadas com NaCl 0,15M e, a cada 100µL de cada diluição, adicionou-se igual volume de uma suspensão de eritrócitos a 2% em NaCl 0,15M de coelhos e do sistema ABO (CORREIA-e-COELHO, 1995). Os tubos foram então incubados em estufa a 37°C por 30 minutos e, em seguida, deixados em repouso à temperatura de 25°C por 30 minutos. A presença da atividade hemaglutinante foi determinada macroscopicamente.

3.9 Determinação do Teor de Proteínas Solúveis

O teor de proteínas solúveis presentes nos extratos da farinha de sementes foi determinado segundo o método descrito por Bradford (1976). A cada 100µL de amostra

adicionou-se 2,5mL de reagente de Bradford. Após a agitação e repouso por 10 minutos, realizou-se a leitura a 595nm em espectrofotômetro.

3.10 Especificidade por Açúcares

A especificidade da lectina por açúcares foi determinada segundo descrito por Moreira e Perrone (1977). A cada 50µL de uma solução de NaCl 0,15M, adicionou-se igual volume da solução de proteínas e desta solução foram feitas diluições seriadas. Às diluições de proteínas, foram adicionadas 50µL de uma solução do açúcar e a mistura foi deixada em estufa a 37°C por 30 minutos, seguidos de outros 30 minutos a temperatura de 25°C. A seguir, adicionou-se 100µL de uma suspensão de hemácias a 2%, e a mistura mantida em estufa a 37°C por 30 minutos, seguidos de outros 30 minutos a temperatura de 25°C.

3.11 Detecção de Saponinas

Por hemólise: pesou-se 6g de agar e dissolvidas em 100ml de solução fisiológica à 60°C. A solução foi tamponada a pH 7,4 com 0,6g de Na₂SO₄. Da solução de Agar aquecida a 30-40°C retirou-se 5ml a qual foi colocada em uma placa de Petri e adicionado 0,2ml de hemácias de coelhos com anticoagulante, após a homogeneização colocou-se em geladeira para solidificar. Após a solidificação, adicionou-se o extrato proveniente das diferentes extrações feitas a partir da farinha de sementes. O resultado positivo verificou-se após 30min através de evidência do halo hemolítico.

3.12 Precipitação por Sulfato de Amônio

O extrato total de sementes de *Abelmoschus esculentus*, obtido a partir Tris-HCl 0,1M pH 7,4, com NaCl 0,15M, foi submetido à precipitação com sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, empregando-se 3 intervalos de saturação: 0-30% (m/v), 30-60% (m/v), 60-90% (m/v), de acordo com Scopes (1994). A cada saturação com sulfato de amônio, a solução foi deixada em descanso por uma noite, centrifugada a 5.000rpm à 4°C por 20 minutos. O precipitado de cada intervalo foi dialisado exaustivamente e liofilizado. As frações obtidas foram submetidas à atividade hemaglutinate e a fração 30-60% foi submetida à cromatografia de troca iônica.

3.13 Cromatografias

Os extratos obtidos de farinha das sementes do quiabo que continha a lectina foram submetidos à cromatografia de afinidade determinada previamente por meio da especificidade por açúcares.

3.13.1 Cromatografia de Troca Iônica

As frações ativas obtidas por cromatografia de afinidade serão recromatografadas em coluna de troca iônica, utilizando o suporte apropriado (DEAE ou CM-celulose) e/ou amônio quaternário (FPLC/HPLC).

3.13.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e β -mercaptoetanol

Estes experimentos foram realizados utilizando-se a técnica descrita por Laemmili (1970). O gel de aplicação foi preparado na concentração de 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 e SDS a 1%. O gel de separação foi preparado formando uma concentração de 12% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 3M, pH 8,8 e SDS a 1%. As amostras oriundas dos extratos protéicos e dos picos cromatográficos, dissolvidos em tampão Tris-HCl 0,625M, pH 6,7, contendo SDS a 2%, glicerol a 10% e β -mercaptoetanol 5%, foram aquecidas em estufa à 100°C durante 10 minutos, centrifugadas por 5 minutos, e em seguida adicionado 10 μ L de azul de bromofenol 0,02%. A corrida foi realizada sob amperagem constante (25mA), em seguida o gel da placa foi fixado em TCA 12,5% por uma hora, sendo então corado com *Cromassie brilliant blue* R-250 a 0,005%. O gel foi então descorado mediante uma solução de metanol, ácido acético e água (1:3, 5:8, v/v/v).

3.14 Determinação da Massa Molecular por Espectrometria de Massa da Lectina da fração 30-60 de Sementes de *Abelmoschus esculentus*

A massa molecular nativa da fração 30-60 de sementes de *Abelmoschus esculentus* foi determinada por ionização electrospray usando um híbrido quadrupolo (Ion Separator Mobilidade) proporcionando aceleração ortogonal por tempo de vôleo a partir de instrumentos

(SYNAPT sistema HDMS-*Waters Corporation*, Milford, E.U.A.). A tensão capilar e a tensão de cone foram fixadas em 3kV e 40V, respectivamente. A amostra de proteína, 10 pmol/ul foi infundida no sistema a uma vazão de 10uL/min. A temperatura da fonte foi mantida em 100°C e nitrogênio foi utilizado como gás de secagem (caudal de 150 l / h). A aquisição dos dados foi realizada por *Mass Lynx 4.0 software* e os espectros MUTIPLY usando técnicas de máxima entropia. (FERRIGE *et al.*, 1992)

3.15 Atividade Hemolítica (Citotoxicidade)

Sangue total humano ABO foi diluído com 30 volumes de salina (0,85% NaCl contendo 10mM CaCl₂, pH 7,4) e mantido sob agitação branda e constante por 15min. Os eritrócitos foram centrifugados (1085g por 5min) e ressuspensos 3 vezes. Várias concentrações de lectinas foram adicionadas às amostras de 2mL de uma suspensão de eritrócitos 0,5% (v/v) em salina. Estas foram incubadas a 25 ± 2°C por 1h e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria (540nm) para quantificar a atividade hemolítica. A hemólise total obteve-se com Triton X-100 e a porcentagem de hemólise calculou-se em relação a esse valor (RANGEL *et al.*, 1997).

3.16 Estudo da Atividade Antiinflamatória em Modelo de Edema de Pata

Os volumes de líquido deslocados pelas patas direitas de cada rato foram medidos pletismograficamente antes (tempo zero) e após 30min., 1, 2, 3, 4, 8, 24 e 48h a injeção subcutânea (s.c) intraplantar dos estímulos inflamatórios (agentes flogísticos, lectina). O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado antes e após o estímulo e expresso em mL. As áreas sob as curvas (ASC) foram calculadas usando o método do trapézio (LANDUCCI, 1995) e expressas em unidades arbitrárias.

3.16.1 Avaliação das Atividades Antiedematogênica

Para a avaliação da atividade antiedematogênica, a lectina de Quiabo foi administrada por via endovenosa (e.v.) nas doses de 0,01; 0,1 ou 1,0mg/Kg contidos em 0,1mL/100g de peso corporal, 30min. antes da aplicação s.c. dos estímulos inflamatórios (carragenina;

2mg/pata) contidos em 0,1mL/100g de peso corporal. O grupo controle positivo de edema foi administrado com carragenina e o controle negativo com salina s.c.

3.17 Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

A metodologia utilizada seguiu o modelo proposto por Vander-Wende e Margolin (1956) para ratos e modificada por Koester, Anderson e De Beer (1959) para camundongos. Os animais receberam ácido acético (0,6%; v/v) por via intraperitoneal, obedecendo à relação 0,1mL/10g de peso corporal. A contagem do número de contorções abdominais foi realizada durante 20 minutos, iniciando-se após 10 minutos da sua indução.

Para avaliar o efeito antinociceptivo da lectina de sementes de *Abelmoschus esculentus* (AES), os camundongos foram tratados com esta lectina nas doses de 0,1, 1 e 10mg/Kg por via endovenosa (plexo intraorbital), 30 minutos antes da injeção de ácido acético. O grupo controle recebeu o mesmo volume de salina.

3.18 Atividade Biológica em Fungos Dermatófitos

3.18.1 Concentração de Lectinas

Os extratos e as lectinas constituirão os tratamentos, foram aplicadas nas concentrações de 0 a 1000µg/mL em intervalos de 50 unidades. Deste modo, pretende-se percorrer concentrações encontradas no material vegetal *in vivo*, bem como a influência destas referidas concentrações multiplicadas.

3.18.2 Ensaio da Atividade Antifúngica

O ensaio de atividade antifúngica foi realizado após o desenvolvimento do fungo, onde cada placa recebeu 4 discos de papel de filtro ($\varnothing=4\text{mm}$) esterilizados (121°C, por 30min), distribuídos a 5cm do centro da placa de Petri de maneira eqüidistante e umedecido (40µL/disco de papel) com a proteína teste/concentração. Os discos foram removidos e substituídos por outros discos contendo a mesma solução de proteínas teste nas mesmas concentrações a intervalos de 12 horas, até a completa inibição do crescimento do fungo. O

desenvolvimento do parasita foi acompanhado macroscopicamente e fotografado periodicamente. Este ensaio foi realizado em triplicata para posterior avaliação dos resultados obtidos. O crescimento/desenvolvimento do fungo foi avaliado utilizando-se os parâmetros de variação da massa fúngica (V), diâmetro da colônia e densidade fúngica. A inibição do ensaio foi realizada utilizando o açúcar específico para cada lectina previamente identificado e padronizado.

3.19 Análise Estatística

De todos os experimentos foram calculadas as médias \pm E.P.M. de um certo número de eventos (2) ou (3) em cada grupo. As diferenças estatísticas entre os grupos foram obtidas através da análise de variância (ANOVA) e testes paramétricos e não paramétricos para múltiplas comparações, onde $P < 0,05$ foi fixado para indicar significância estatística.

REFERÊNCIAS

AGRUJURIS. **Cultura do quiabo**. Disponível em <<http://www.agrojuris.eng.br/minicurso/culturadoquiabo/1.01culturaquiabo.htm>>. Acesso em: 27 abr. 2004.

ALLEN, N. K.; BOLWELL, G. P.; BROWN, D. S.; SIDEBOTTOM, C.; SLABAS, A. R. Potato lectin: a three-domain glycoprotein with novel hydroxyproline-containing sequences and sequence similarities to wheat-germ agglutinin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.28, n.11, p.1285-1291, Nov.1996.

ANTUNES, P. L.; SGARBIERI, V. C. Effect of heat treatment on the toxicity value of dry bean (*Phaseolus vulgaris* var. Rosinha G2) proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v.28, n.5, p.935-938, 1980.

ARRUDA, V. M. **Avaliação farmacológica das atividades antiinflamatória, analgésica e anti-ulcerogênica do fitoterápico Sanativo**. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ASHFORD, D.; ALLEN, A. K; NEUBERGER, A. The production and properties of an antiserum to potato (*Solanum tuberosum*) lectin. **Biochemistry Journal**, v.201, n.3, p.641-645, Mar. 1982.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T.B.; FREITAS, L.A.R. & BARRAL-NETTO, M. In Vivo Lymphocyte Activation and Apoptosis by lectins of the Diocleinae Subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.5, p.673-678, 2001.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S. B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L. I. M.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, R. A; OLIVEIRA, J. T.A. Human lymphocyte by legume lectins from the Diocleinae tribe. **Immunological Investigations**, v 21, n.4, p. 297-303, 1992.

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

BRADFORD, M. M. A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, n.1, p.248-254, 1976.

BROEKAERT, W. F.; VANPARIJS, J.; LEYNS, F.; JOOS, H.; PEUMANS, W.J. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. **Science**, v.245, p.1100-1102, 1989.

BUSCH, E.; LELLEY, J. I. Agglutination of yeast cells by fungal lectins as a part of a quality control for ectomycorrhizal fungi. **Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik**, v.74, n.1-2, p.83-86, 2000.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting *proteus*: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**, Hil versum, v.2, n.2, p.123-135, Jun. 2001.

CAVADA, B.S.; MOREIRA-SILVA, L.I.M.; GRANJEIRO, T.B.; SANTOS, C.F.; PINTO, V.P.T.; BARRAL-NETTO, M.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; GOMES, J.C.; MARTINS, J.L.; OIOLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A. Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind **Seeds**. (Van Driessche, E; Fisher, J; Beekmans, S.; Bog-Hansen, T.C.; eds),Textop, Denmark, p. 74-80, 1996.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 4.ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap.6, p.197-253.

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

COSTA, M. C. B.; OLIVEIRA, G. D.; HAAG, H. P. Nutrição mineral de hortaliças – Efeito da omissão dos macronutrientes e do boro, no desenvolvimento e na composição química de hortaliças. In: HAAG, H. P.; MINAMI, K. **Nutrição mineral em hortaliças**. Campinas: Fundação Cargill, 1981.cap.6, p. 257-276.

DEL-VECHIO, G.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D. Efeito do tratamento térmico em sementes de abóboras (*curcubita* spp.) sobre os níveis de fatores antinutricionais/e/ou tóxicos **Ciência. Agrotecnologia**, v.29, n.2, p. 369-376, 2005.

DI ROSA, M. Pharmacological properties of carrageenan. **Journal harmacocynetics and Pharmacodynamics**, v.24, p. 89-102, 1972.

EVERTS, I.; VILLMANN, C.; HOLLMANN, M. N-glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. **Molecular Pharmacology**, v 52, p.861-873, 1997.

FERREIGE, A.G.; SEDDON, M.J.; GREEN, B.N.; JARVISA, S.A., SKILLING, J. Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. **Rapid Commum Mass Spectrom**, v.6, p.707-711, 1992.

GADELHA, C. A. A.; MORENO, F. B. M. B.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J. B.; ROCHA, B. A. M.; ASSREUY, A. M.; MOTA, M. R. L.; PINTO, N. V.; MEIRELES, A. V. P; BORGES, J. C.; FREITAS, B. T.; CANDURI, F.; SOUZA, E. P.; DELATORRE, P.; CRIDDLE, D. N.; AZEVEDO JR, W. F.; CAVADA, B. S. Native Crystal Structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **Journal of Structural Biology**, v.152, n.3, p.185-194, Dec. 2005.

GARCIA-CRUZ, C. H. Uso de hidrocolóides em alimentos: revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.87, p.19-29, 2001.

GOMEZ, M. R. Metal content monitoring in *Hypericum perforatum* pharmaceutical derivatives by atomic absorption and emission spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.34, n.3, p.569-576, Feb. 2004.

GREGORINI, S. D. Folliculotropic T cells in Regressive Basal Cell Carcinoma of Skin. **American Journal Dermatopathology**, v. 22, n.1, p. 30-33, 2000.

HONMURA, A.; YANESE, M.; OBATA, J.; HARUKI, E. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. **Lasers Surgery Medical**, v.12, p.441-449, 1999.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz**. 4º Edição Digital, Brasília, 2005.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M; CAPRA, J. D. O estudo dos linfócitos e Imunidade mediada por células T. In: **Imunobiologia. O sistema imunológico na saúde e na doença**. 4º Edição, Rio de Janeiro: Ed.Artmed, 2000,C-2:59-60\267-269.

KALE, M.; MISAR, A. V.; DAVE, V.; JOSHI, M.; MUJUNDAR, A. M. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.300-304, 2007.

KINUPP, V. F. Riqueza de plantas alimentícias não convencionais na região metropolitana de Porto Alegre. Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, n.1, p.63-65, 2007.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E..J. **Acetic acid for analgesic screening**. Fed. Proc., v.18, p.412-416, 1959.

KWON-CHUNG K.J.; BENNETT J.E. **Medical Mycology**, 4th edn. Lea & Febiger, Philadelphia. 1992. 496p.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t₄. **Nature**, London, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

LANDUCCI, E. C. T. **Envolvimento das fosfolipasas do tipo A2 (PLA2) no processo inflamatório. Atividade antiinflamatória da crotapotina.** Ph.D. Tese. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, 1995.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrates specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, Washington, v.98, n.2, p.637-674, 1998.

LOPES, W. B.; MORONI, F. T.; BRANDEBURGO, MIH.; HAMAGUCHI, A. **Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais.** Disponível em: <www.propp.ufu.br/revistaeletronica>. Acesso em: 3 jul. 2005.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica Et Biophysica Acta – General Subjects**, Amsterdam, v.1572, n.2-3, p.198-208, 2002.

MATSUI, T.; HAMAKO, J.; OZEKI, Y.; TITANI, K. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. **Biochimica Et Biophysica Acta – General Subjects**, Amsterdam, v.1525, n.1-2, p.50-57, 2001.

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

MELLO, J. C. P. Estudo mineral das espécies vegetais *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Bouchea fluminensis* (vell) Mold. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.15, n.2, p133-136, 2005.

MO, H.; VAN DAMME, E.J.P.; PEUMANS, W.J.; GOLDSTEIN, I. J.; Purification and characterization of a mannose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs; **Achieves of Biochemistry and Biophysics**, v. 306 n. 2; p. 431-438, 1994.

MOREIRA, R. A.; CASTELO-BRANCO, C. C.; MONTEIRO, A. C. O.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v.47, n.7, p.1183-1188, Apr. 1998.

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis*. Isolation, characterization and behavior during germination. **Biol. Plantarum**, v. 26, p. 113-120, 1984.

MOREIRA, R.A.; CORDEIRO, E.F.; GRANJEIRO, T.B.; MARTINS, J.L.; RAMOS, M.V; OLIVEIRA, J.T.A;CAVADA, B.S Isolamento e caracterização parcial de lectina de *Bauhinia pentrada*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, p. 23-29, 1996.

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

NAPPI, J. A.; VASS, E. Interaction of iron with reactive intermediate of oxygen and nitrogen. **Developmental Neuroscience**, v.24, n.2-3, p.134-142, 2002.

NASCIMENTO, G. F. G.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n.2, p. 247-256, 2000.

NOMURA, K.; ASHIDA, H.; UEMURA, N.; KUSHIBE, S.; OZAKI, T.; YOSHIDA, M. Purification and characterisation of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. **Phytochemistry**, v.49, 667-673, 1998.

OLIVEIRA, J. T. A; CAVADA, B. S; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v .14, p. 61-66, 1991.

PETTIBONE, M. H. Polynoidae and Sigalionidae (Polychaeta) from the Guaymas Basin, with descriptions of 2 new species, and additional records from hydrothermal vents of the Galapagos Rift, 21°N, and seep sites in the Gulf of Mexico (Florida and Louisiana). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v.102, p.154–168, 1989.

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

PEUMANS, W. J.; ZHANG, W.; BARRE, A.; ASTOUL, C. A.; BALINTI-KURTI, P. J.; ROVIRA, P.; ROUGÉ, P.; MAY, G. D.; VAN LEUVEN, F.; TRUFFA-BACHI, P.; VAN DAMME, E. J. M. Fruit-specific lectins from banana and plantain. **Planta**, Berlim, v.221, n.6, p.546-554, Nov. 2000.

PUSZTAI, A. Chemistry & Pharmacology of Natural Products - **Plant Lectins**. Cambridge University Press, Cambridge, 2000.

RAMOS-e-SILVA, M. **Amorolfina** - Minha opinião. Universidade Federal do Rio de Janeiro HUCFF-UFRJ. v.1, n.1, p.1-2, 2000.

RANGEL, M.; MALPEZZI E.L.A.; SUSINI, S.M.M.; FREITAS, J.C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v.35, n.2, p.305-309, Feb. 1997.

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

RIBEIRO, M. G.; SCHIMIDT, E. M. S. Relato do uso de cicatrizante à base de sulfadiazina de prata 1% micronizada em equino. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v.3, n.2, p.179-184, ago./dez. 2000.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 7ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 112-123.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/manose binding plant lectins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, p.823-826, 1992.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, v.18, p.589–613, 2001.

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

SCOPES, R. K. **Protein purification**: principles and practices. 3ed. New York: Springer Verlag, 1994, p. 380. (Springadvanced texts in chemistry).

SGARBIERI, V. C. Composition and nutritive value of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Review of Nutrition and Dietetics**, Basel, Karger, v. 60, p. 132-198, 1989.

SGARBIERI, V. C.; WHITAKER, J. R. Physical, chemical, and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. **Advances in Food Research**, New York, v.28, p.93-166, 1982.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. Second Edition. Dordresh/Netherlands. Kluwer Academic Publishers, 2003.

SILVA, C. V. **Melhoramento Genético do Quiabeiro**, 2004. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/bioano01/div11.htm>>. Acesso em: 09 ago. 2004.

SILVA, M. C. **Caracterização parcial da lectina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

TRIGUEIROS, V.; LOUGARRE, A.; ALI-AHMED, D.; RAHBÉ, Y.; GUILLOT, L.C.; FOURNIER, D.; PAQUEREAU, L. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1621, n.3, p. 292-298, Jun. 2003.

TURTON, K., R. N.; NATESH; THIYAGARAJAN; CHADDOCK, J.A.; ACHARYA, K. R. Crystal structures of *Erythrina cristagalli* lectin with bound N-linked oligosaccharide and lactose. **Glycobiology**, v.14, n.10, p.923-929, 2004.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J.: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v.183, p.258-262, 1991.

VAN RHIJN, P.; GOLDBERG, R. B.; HIRSCH, A. M. *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. **Plant Cell**, v.10, n.8, p.1233-1250, Aug. 1998.

VANDER WENDE, C.; MARGOLIN, S. Analgesic tests based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. **Fed Proc**, v.15, p.494, 1956.

VASCONCELOS, I.M.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Purification and partial characterization of a lectin from the seed of *Dialcea guianensis*. **Journal of Food Biochemistry**, v 15, p.137-154, 1991.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, Oxford, v.44, n.4, p.385-403, Sep. 2004.

WEBSTER DICTIONARY. The American Heritage Dictionary of the English Language, Fourth Edition Copyright 2009 by Houghton Mifflin Company. Published by Houghton Mifflin Company.

WEITZMAN, R. C.; SUMMERBELL, J. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, p.240–259, 1995.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v.47, n.2, p.183-187, Jan. 1998.

YE, X. Y.; NG, T. B. Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-kDa protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.285, n.2, p.424-429, Jul. 2001.

YEMN, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v.57, n.3, p.508-514, Jul. 1954.