



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

NÍVEL DOUTORADO

Avaliação de atividades biológicas de lectina de folhas de
***Bauhinia monandra* (BmoLL)**

CHRISJACELE SANTOS FERREIRA DE ARAUJO

RECIFE

2015

CHRISJACELE SANTOS FERREIRA DE ARAUJO

Avaliação de atividades biológicas de lectina de folhas de
***Bauhinia monandra* (BmoLL)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para a obtenção do título em Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia de Menezes Lima

RECIFE

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Araujo, Chrisjacele Santos Ferreira de
Avaliação de atividades biológicas de lectina de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL)/ Chrisjacele Santos Ferreira de Araújo– Recife: O Autor, 2015.

114 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Coorientadora: Vera Lúcia de Menezes Lima

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui referências

- 1. Lectinas 2. *Bauhinia* 3. Diabetes I. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso (orientadora) II. Lima, Vera Lúcia de Menezes (coorientadora) III. Título**

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-074

CHRISJACELE SANTOS FERREIRA DE ARAUJO

Avaliação de atividades biológicas de lectina de folhas de
***Bauhinia monandra* (BmoLL)**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (UFPE) - Orientadora

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (UFPE) – Membro interno

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (UFPE) - Membro interno

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (UFPE) - Membro interno

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (UFRPE) - Membro externo

Data: 12 / 02 / 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus antes de tudo, por todos os risos que me deram forças e pelas horas difíceis que me ensinaram muito. Agradeço ainda por todos que conheci e por todas as amizades que fiz, como também pela família na qual Ele me colocou: sem meus pais, sem meu irmão e todos os que amo, nunca estaria onde estou! Por tudo obrigada Senhor! Agradeço a Nailton Oliveira, que sempre acreditou que eu conseguiria e sempre confiou em mim!

Agradeço a Prof.^a Luana Cassandra, Prof.^o Thiago Napoleão, Profa. Patrícia Paiva, Profa. Tereza Correia e Prof.^a Vera Menezes, com quem, de forma direta ou indireta aprendi e amadureci com os ensinamentos e exemplos de todos e que confiaram e me deram essa oportunidade.

A todos os pesquisadores que colaboram com a execução dos experimentos.

De maneira especial agradeço a todas as pessoas que foram determinantes no trabalho do dia-a-dia, que me acompanharam diante da construção de todo esse trabalho.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão de bolsa de Doutorado e apoio a projetos de pesquisa que possibilitaram a execução dessa Tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para realização de todas as etapas do projeto, inclusive os experimentos na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Obrigada Deus!

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”

(Los Hermanos).

RESUMO

As plantas do gênero *Bauhinia* (Família *Fabaceae*) são encontradas na África, Ásia bem como América Central e do Sul. No Brasil, elas são conhecidas como “pata-de-vaca” e as suas folhas são usadas popularmente em forma de chá (infusão) para o tratamento de diabetes, como anti-inflamatório e como analgésico. Dentre diversos compostos purificados de plantas estão as lectinas, as quais são proteínas ou glicoproteínas que se ligam a carboidratos, por reconhecimento específico e reversível. Das folhas da espécie *Bauhinia monandra* foi purificada uma lectina galactose específica (BmoLL, *B. monandra Leaf Lectin*) através de cromatografia de afinidade em gel de guar. Diante das atividades descritas para as lectinas e do uso das plantas do gênero *Bauhinia* na medicina popular, foi levantada a hipótese de que as atividades biológicas relatadas pela população *B. monandra* têm como princípio ativo a lectina BmoLL. Desta forma o objetivo do presente estudo foi investigar propriedades toxicológicas, hipoglicemiante, anti-inflamatória e antinociceptiva da lectina. BmoLL não apresentou toxicidade para camundongos, uma vez que não induziu a morte nem perda de peso a 2000 mg/kg. Além disso, ela não afetou a sobrevivência de *Artemia salina* nas concentrações testadas (250-1.000 µg/mL). A atividade hipoglicemiante da BmoLL foi avaliada utilizando em camundongos NOD (*non obese diabetic*) como modelo experimental. Camundongos NOD diabéticos foram tratados com BmoLL (60 mg/kg/dia) por administração intraperitoneal durante 21 dias. O efeito da lectina foi comparado com os dados obtidos para um grupo diabético não-tratado e um grupo não-diabético (normoglicêmico). No final do experimento, os animais tratados com BmoLL exibiram uma redução do nível de glicose no sangue (de $307,5 \pm 83,3$ mg/dL para $137,5 \pm 68,3$ mg/dL), atingindo valores semelhantes ao do grupo normoglicêmico ($110,5 \pm 16,7$ mg/dL). O grupo diabético não-tratado apresentou concentração de glicose sanguínea ≥ 500 mg/dL. Além disso, as concentrações de triglicéridos e VLDL-colesterol no sangue foram significativamente reduzidas ($p < 0,05$) pelo tratamento com BmoLL, em comparação com os animais diabéticos não tratados. Para avaliação da atividade antiinflamtória, foi realizado primeiramente o método de edema de pata induzido por carragenina. BmoLL reduziu a inflamação significativamente ($p < 0,05$) em 47% (30 mg/kg) e 60,5% (60mg/kg). O grupo controle, tratado com ácido acetilsalicílico, apresentou 70,5% de redução. Na avaliação da atividade atiinflamatória por ensaio de peritonite, a migração de leucócitos foi significativamente reduzida ($p < 0,05$) no grupo tratado com BmoLL, sendo o resultado semelhante ao obtido com grupo tratado com ácido acetilsalicílico. Na avaliação da atividade antinociceptiva BmoLL, os tratamentos com doses de 15, 30 e 60 mg/kg reduziram significativamente ($p < 0,05$) o número de contorções abdominais (induzidas por ácido acético) em 43,1%, 50,1% e 71,3%, respectivamente. No ensaio de placa quente, a BmoLL em doses de 30 e 60 mg/kg, mostrou um efeito antinociceptivo significativo ($p < 0,05$). Em conclusão, BmoLL é uma molécula interessante para ser estudada mais profundamente quanto a suas aplicações farmacológicas, desde que não apresentou toxicidade aguda para camundongos e demonstrou as atividades hipoglicemiante, anti-inflamatória e antinociceptiva, não apresentou toxicidade para *A. salina* nem para camundongos.

Palavras-Chave: *Bauhinia monandra*, lectina, toxicidade, atividade hipoglicemiante, anti-inflamatório, antinociceptivo.

ABSTRACT

Plants of *Bauhinia* genus are found in Africa, Asia as well as in Central and South America. In Brazil, they are known as “pata-de-vaca” and their leaves are popularly used as tea (infusion) to treat diabetes, as anti-inflammatory and as analgesic. Among the compounds isolated from plants, there are the lectins, which consist in protein or glycoproteins that bind carbohydrates by reversible and specific recognition. From the leaves of *Bauhinia monandra*, it was isolated a galactose-specific lectin (BmoLL, *B. monandra* Leaf Lectin) by affinity chromatography on guar gel. In face of the biological activities described for lectins and the use of *Bauhinia* plants in folk medicine, it was hypothesized whether the biological activities reported by population for *B. monandra* have the lectin BmoLL as active principle. In this sense, the aim of this work was to investigate toxicological, hypoglycemic, anti-inflammatory, and antinociceptive properties of the lectin. BmoLL did not show toxicity to mice since it did not induce death and weight loss at 2,000 mg/kg. In addition, it did not affect the survival of *Artemia salina* at the tested concentrations (250-1,000 µg/mL). The hypoglycemic activity of BmoLL was evaluated using NOD (non obese diabetic) mice as experimental model. Diabetic NOD mice were treated with BmoLL (60 mg/kg/day) by intraperitoneal administration during 21 days. The lectin effect was compared with data obtained for a non-treated diabetic group and a non-diabetic (normoglycemic) group. At the end of the experiment, animals treated with BmoLL showed reduction in blood glucose level (from 307.5 ± 83.3 mg/dL to 137.5 ± 68.3 mg/dL), reaching values similar to those from normoglycemic group (110.5 ± 16.7 mg/dL). Non-treated diabetic group showed blood glucose ≥ 500 mg/dL. In addition, the concentrations of triglycerides and VLDL-cholesterol in blood were also significantly ($p < 0.05$) reduced by the treatment with BmoLL, in comparison with non-treated diabetic animals. For the evaluation of the anti-inflammatory activity, it was first performed the carragenan-induced paw edema method. BmoLL reduced the inflammation significantly ($p < 0.05$) in 47% (30 mg/kg) and 60.5% (60 mg/kg). The control group, treated with acetylsalicylic acid, showed a 70.5% reduction. In the evaluation of anti-inflammatory activity by peritonitis model, the leukocyte migration was significantly ($p < 0.05$) reduced in the group treated with BmoLL, being the result similar to that obtained for the group treated with acetylsalicylic acid. In the evaluation of the antinociceptive activity of BmoLL, the treatments with doses of 15, 30, and 60 mg/kg reduced significantly ($p < 0.05$) the number of abdominal writhings (induced by acetic acid) in 43.1%, 50.1% and 73.1%, respectively. In hot plate assay, BmoLL at 30 and 60 mg/kg showed a significant antinociceptive effect. In conclusion, BmoLL is an interesting molecule to be more deeply studied for its pharmacological applications since it did not show acute toxicity to mice and showed the biological activities described in this work.

Key-words: *Bauhinia monandra*; lectin; toxicity; hypoglycemic activity, anti-inflammatory; antinociceptive.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Representação esquemática da rede de eritrócitos promovida pela ligação cruzada de uma lectina a carboidratos de superfície e (B) inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos livres. Aspectos de ensaio em placas de microtitulação (inserções).....	19
Figura 2. Aspectos de <i>Bauhinia monandra</i>	24
Figura 3. Ilhota de Langerhans no pâncreas.....	28
Figura 4. Produção e ação da insulina no organismo humano.....	29
Figura 5. Camundongos NOD.....	32
Figura 6. Aspectos da <i>Artemia salina</i> : (A: adulto, B: Náuplio).....	34
Figura 7. Conceitos de dor.....	37
Figura 8. Aspectos do Processo inflamatório.....	39

ARTIGO 1

Figure 1. Assessment of the effects of oral ingestion of BmoLL on weight of mice. Weight of mice at each day of test in control and BmoLL treatments. Identical letters indicate no significant differences ($p>0.05$).....	74
--	----

ARTIGO 2

Fig. 1. Blood glucose levels from diabetic NOD mice treated or not with pure BmoLL at time 0 (zero), before treatment, as well as after 7, 14, and 21 days of treatment (three groups, $n = 4$). A non-diabetic (normoglycemic) group was also accompanied during the same period. The BmoLL-treated diabetic group received a dose of 60 mg/kg/day; the non-treated diabetic group received vehicle (water). After 7 days, BmoLL-treated group showed a statistically significant difference ($p<0.05$) as compared with non-treated diabetic group. The BmoLL-treated group compared with non-diabetic (normoglycemic) group did not show statistically significant difference ($p>0.05$).....	91
--	----

Fig. 2. NOD mice weighing during the assay period, divided into time 0 (zero), start of treatment, as well as after 7, 14 and 21 days of treatment. The groups were: non-treated diabetic group (water); BmoLL-treated diabetic group (60mg/kg/day), non-diabetic (normoglycemic) group. Different lowercase letters indicate significant ($p<0.05$) differences between the values determined for non-treated diabetic group at different times. Different uppercase letters indicate significant ($p<0.05$) differences between the values determined for BmoLL-treated diabetic group at different times. Different symbols indicate significant ($p<0.05$) differences between the values determined for non-diabetic group at different times.....92

Fig. 3. Average per group of the ratio (%) between liver weights and body weights from NOD mice, divided into the following groups: non-treated diabetic group (water); BmoLL-treated diabetic group (60mg/kg/day), non-diabetic (normoglycemic) group. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$) between treatments.....93

ARTIGO 3

Figure 1. Effect of BmoLL in the thickness of the right posterior edema of mice. ASA, acetylsalicylic acid. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significant difference in comparison to the control group: $*P<0.05$112

Figure 2. Effect of BmoLL in the leukocyte migration in the model of carrageenan-induced peritonitis. ASA, acetylsalicylic acid. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significant difference in comparison to the control group: $*P<0.0001$112

Figure 3. Effect of BmoLL in the number of writhes in the model of nociception induced by acetic acid. ASA, acetylsalicylic acid. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significant difference in comparison to the control group: $*P<0.0001$113

Figure 4. Analgesic effect of BmoLL in latency time in the hot plate assay on mice. ASA, acetylsalicylic acid. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significant difference in comparison to the control group: *P<0.001.....113

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

Table 1: Lipid profile in NOD mice from BmoLL-treated diabetic, non-treated diabetic, and non-diabetic (normoglycemic) groups. The values were determined at the end of experiment (21st day after treatment beginning).....	94
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Americana Diabetes Association
BmoLL	Lectina de folhas da <i>B. monandra</i> (<i>B. monandra Leaf Lectin</i>)
BmoRoL	Lectina de raízes secundarias de <i>Bauhinia monandra</i>
CMoL	Lectina de sementes de <i>Moringa oleífera</i>
CramoLL 1,4	Lectina de sementes de <i>Cratylia mollis</i>
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
NOD	Camundongos (<i>Non Obese Diabetic</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 Lectinas.....	16
2.1.1 Lectinas de plantas.....	22
2.1.2 Gênero <i>Bauhinia</i>	23
2.2 <i>Diabetes Mellitus</i>	27
2.3 Camundongos NOD (<i>Non Obese Diabetic</i>).....	32
2.4 Testes Toxicológicos.....	33
2.4.1 Bioensaio com <i>Artemia salina</i>	34
2.4.2 Avaliação da toxicidade oral.....	35
2.5 Dor e Inflamação.....	36
2.5.1 Analgésicos e Antiinflamatórios.....	40
2.5.2 Testes antiinflamatórios e antinociceptivos.....	41
2.5.2.1 Ensaio Anti-inflamatório: Peritonite induzida por carragenina.....	42
2.5.2.2 Ensaio Anti-inflamatório: Edema de pata.....	43
2.5.2.3 Atividade analgésica: Contorção abdominal	44
2.5.2.4 Atividade analgésica: Método da placa quente.....	45
3. OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo Geral.....	47
3.2 Objetivos específicos.....	47
4. REFERÊNCIAS.....	48
5. ARTIGO CIENTÍFICO 1	65
6. ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	75
7. ARTIGO CIENTÍFICO 3.....	95
8. CONCLUSÃO	114

1. INTRODUÇÃO

As plantas têm sido usadas como fontes de medicamentos desde a Pré-História é perceptível que nas últimas quatro décadas tem havido um ressurgimento do interesse no estudo e utilização de medicamentos derivados de plantas (ARAÚJO et al., 2011). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% de toda população mundial fazem uso de medicina popular, direcionados para cuidados primários de saúde (JORDAN et al., 2010; MINITERIO DA SAÚDE, 2012).

Diante do uso na medicina popular, há a necessidade de pesquisas científicas na busca de comprovação ou desmistificação de tais plantas, pois o uso por parte da população dessas infusões ou outras preparações pode trazer riscos devido ao fato de extratos de plantas terem em sua composição diversas substâncias que podem apresentar toxicidade. Ainda é preciso comprovar e identificar os compostos que apresentam as propriedades desejadas sendo necessária purificação de tais compostos (EIDT et al., 2013; CARVALHO et al., 2013; COSENZA et al., 2013; BORDE, et al 2014; TOFIGHI et al., 2015)

As plantas do Gênero *Bauhinia* (Família *Fabaceae*) são encontradas na África, Ásia bem como América Central e do Sul (KHALIL, et al., 2008). No Brasil são conhecidas como “pata-de-vaca” e as suas folhas são usadas popularmente em forma de chás (infusão) para o tratamento de diabetes, como anti-inflamatório e analgésico (SILVA e CECHINEL- FILHO, 2002). Devido ao amplo uso na medicina popular, o Gênero *Bauhinia* está sendo constantemente pesquisado, por exemplo, extratos da casca de caule *Bauhinia guianensis* apresentaram atividade anti-inflamatória no modelo de edema de pata em ratos, induzido por carragenina, além de efeito analgésico no modelo de contorções abdominal induzido por ácido acético em camundongos (CARVALHO et al., 1999). Estudos com extrato bruto de *Bauhinia forficata* revelaram atividade antiedematogênica associada à ação analgésica periférica,

demonstrando fortes indícios de que estaria associada também com atividade anti-inflamatória (LUZ, 1995). Extratos hidro alcoólico de *Bauhinia splendens* em acetato de etila (10 mg/kg) das folhas, caules, cascas e raízes, demonstraram atividade analgésica (WILLAIN et al., 1997). Em humanos, foi observada uma diminuição na glicemia de grupo diabético tratado com chá (infusão) de *Bauhinia forficata* (MORAES et al., 2010). Enquanto extrato hidroetanólico apresentou, em ratos com diabetes induzido, um nível significativo de toxicidade hepática, não melhorando de forma fisiológica as alterações que são consequências do diabetes (PEPATO et al., 2010).

Dentre diversos compostos purificados de plantas estão as lectinas que são proteínas ou glicoproteínas que se ligam a carboidratos, por reconhecimento específico e reversível sendo de origem não imune (LAM e NG., 2010). Tais carboidratos reconhecidos pelas lectinas podem desempenhar papéis importantes no armazenamento ou na transmissão de informação dentro da célula ou entre as células (ARAÚJO et al., 2011), assim são excelentes em investigações como agentes terapêuticos (NEUMANN et al., 2004; ANDRADE et al., 2004; SANTI-GADELHA et al., 2006; BITENCOURT et al., 2008). Uma lectina de *Bauhinia bauhinioides* (BbL) apresentou atividade anti-inflamatória (BEZERRA, 2012).

Das folhas da espécie *B. monandra* foi purificada uma lectina (BmoLL, *B. monandra Leaf Lectin*) (COELHO e SILVA, 2000). Diante das atividades encontradas para outras lectinas e do uso da medicina popular das plantas do gênero *Bauhinia*, foi levantada a hipótese de que atividades biológicas relatadas pela população para essa espécie tenham como principal principio ativo a lectina BmoLL. Desta forma o objetivo do presente estudo foi investigar propriedades, anti-inflamatórias, antinociceptivas, hipoglicemiantes e toxicológicas da lectina (BmoLL, *B. monandra Leaf Lectin*).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Lectinas

Lectinas são proteínas que possuem pelo menos um domínio de reconhecimento a carboidratos. As lectinas se ligam aos carboidratos de forma específica e de maneira reversível (BARONDES, 1988; AMBROSI et al., 2005; LAM et al., 2010).

As interações entre lectinas e carboidratos ocorrem através de especificidade com ligações reversíveis de determinada lectina com glicoproteínas ou grupo de carboidratos (oligossacarídeos) ou um carboidrato específico (PEUMANS e VAN DAMME, 1995, PEUMANS et al., 2001, WU et al., 2006,). Sabendo que a seletividade é obtida por pontes de hidrogênio, interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas entre a lectina e o carboidrato (KENNEDY et al., 1995; SHARON, 1993; COMINETTI et al., 2002; SHARON, 2007). Quando lectinas que possuem mais de um sítio de ligação reconhecem carboidratos presentes em células distintas, elas podem promover um fenômeno de aglutinação.

A característica de aglutinação por lectinas teve seu primeiro relato em 1888 por Stilmark que atribuiu aglutinações de eritrócitos a presença de uma proteína presente em preparação proteica parcialmente pura obtida do extrato da planta conhecida por mamona, *Ricinus communis* (KENNEDY et al., 1995). Em 1889 H. Helin observou a presença de uma hemaglutinina tóxica em sementes de Jequiriti, *Abrus precatorius*, (SHARON, 2007).

Além das lectinas, outras moléculas como anticorpos, anticarboidratos também aglutinam células. Assim, devido à especificidade, as lectinas eram consideradas semelhantes aos anticorpos, mas diferem quando se refere à origem e similaridade estrutural, onde entre as lectinas há enorme diversidade enquanto os anticorpos são estruturalmente similares (VAN DAMME et al., 1998).

Outros relatos de lectinas foram feitos já nos anos 40. Boyd e Reguera observaram aglutininas em sementes com especificidade para antígenos dos grupos sanguíneos humanos (SHARON e LIS, 2004). Novamente, a característica de aglutinar eritrócitos foi demonstrada, tendo algumas lectinas inclusive afinidade específica para grupos sanguíneos.

O termo “Lectinas” foi usado pela primeira vez no ano de 1954 por Boyd e Shapleigh, vindo do Latim: *Lectus*, que significa selecionado, foi usado devido à capacidade de ligação reversível a carboidratos e aglutinação seletiva de eritrócitos de grupos sanguíneos específicos (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). A escolha do termo lectinas foi determinante na definição dessas proteínas baseada na seletividade a carboidratos, assim como na diversidade estrutural.

O estudo dessas proteínas com atividade hemaglutinante foi aprofundado em 1960, pois começaram a ser pesquisadas aplicabilidades (GABOR, KLAUSEGGER e WIRTH, 2001). Em 1965, Agrawal e Goldstein isolaram a lectina Con-A (Concanavalina-A) extraída de sementes de *Canavalia ensiformis*, uma leguminosa, a partir de uma cromatografia de afinidade em uma matriz de dextrana (Sephadex), tendo a lectina afinidade à glicose e seus derivados. Em 1981, lectinas encontradas tanto em animais quanto em plantas já haviam sido purificadas (DEBRAY et al, 1981).

Atualmente, lectinas são consideradas de natureza ubíqua, pois estão presentes em todos os organismos como plantas (YAN et al., 2010) vírus, bactérias e fungos (TRIGUEIROS et al., 2003) além de peixes (SILVA et al, 2012; KANIA et al., 2010), serpentes (NUNES et al., 2011) e outros animais (ZHAO et al., 2009; WANG et al., 2009; KILPATRICK, 2002; BATTISON e SUMMERFIELD, 2009). Lectinas foram ainda isoladas de células-tronco embrionárias (ALVAREZ-MANILLA et al., 2010).

As lectinas são classificadas de diversas formas. Dentre elas as lectinas de plantas tiveram sua classificação estabelecida por Peumans e Van Damme (1998) com base na

estrutura: Merolectinas: possuem um único domínio ligante a carboidrato, não precipitando glicoconjugados nem aglutinando células, sendo, portanto, proteínas de pequeno tamanho. Hololectinas: com no mínimo dois domínios idênticos ou homólogos se ligam a açúcares similares ou ao mesmo carboidrato, podem aglutinar células e precipitar glicoconjugados, são di ou multivalentes. Quimerolectinas: moléculas com um ou mais domínios ligantes a carboidratos, associados com outro domínio distinto, tendo outra atividade biológica, podendo ser enzimática ou não, independente do domínio ligante a carboidratos. Superlectinas: possuem no mínimo dois domínios ligantes a carboidratos, estruturalmente diferentes.

Diante de sua diversidade estrutural, cada lectina pode apresentar características próprias, em uma variedade de especificidades, podendo interagir com glicoproteínas, oligossacarídeos ou monossacarídeos específicos (KENNEDY et al., 1995; SHARON, 1993; COMINETTI et al., 2002; SHARON, 2007).

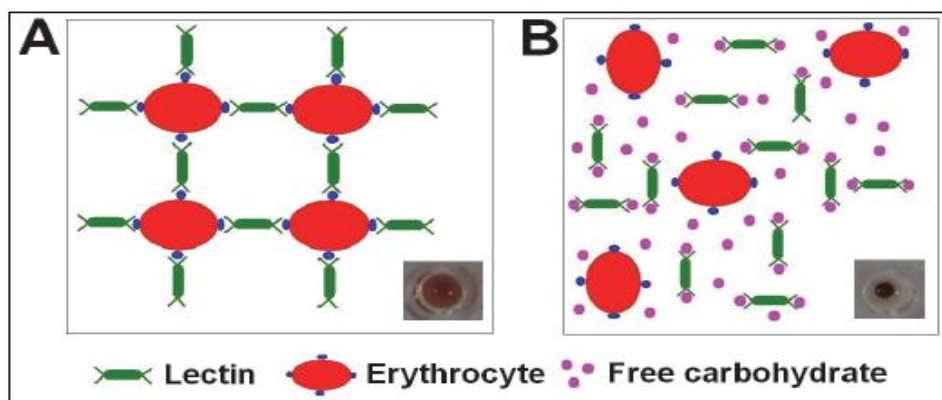
Durante a busca por aplicabilidades biológicas das lectinas é preciso um processo de purificação. A maioria das lectinas é solúvel em água, solução salina e/ou tampão, sendo necessárias técnicas para eliminar outras moléculas (contaminantes), o que envolve fatores como temperatura, solução extratora entre outros (KAWAGISHI et al., 2001; OSHIKAWA et al., 2000; MOURE et al., 2001). Além da eliminação de outras moléculas é preciso manter a lectina estável fora de seu meio biológico. A técnica mais usada para verificação da presença e da estabilidade das lectinas em uma determinada solução é atividade hemaglutinante.

A possibilidade de verificação da atividade hemaglutinante das lectinas em determinada solução, seja um extrato ou uma proteína pura se dá devido à capacidade de lectinas em aglutinar eritrócitos, os quais podem ser tratados enzimaticamente por tripsina, dentre outros, como também quimicamente por glutaraldeído ou formaldeído (CORREIA e COELHO, 1995; COELHO e SILVA, 2000; MO et al., 2000). O ensaio de hemaglutinação permite a avaliação da estabilidade da lectina a valores de pH e temperatura e, portanto, pode

determinar as condições a serem usadas na aplicação biotecnológica de lectina (PAIVA, et al., 2010).

A atividade hemaglutinante visualizada no esquema da Figura 1, onde no campo (A) as lectinas formam uma malha junto aos eritrócitos devido à sua ligação com os carboidratos presentes na superfície destes. No campo (B), na presença de carboidratos livres, as lectinas se ligam a esses carboidratos e não mais aos eritrócitos no ensaio denominado “inibição da atividade hemaglutinante”. Nos dois campos são mostradas imagens das microplacas representadas nos esquemas.

Figura 1. (A) Representação esquemática da rede de eritrócitos promovida pela ligação cruzada de uma lectina a carboidratos de superfície e **(B)** inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos livres. Aspectos de ensaio em placas de microtitulação (**inserções**).



Fonte: (PAIVA et al., 2011).

Diante da busca por caracterizar e purificar uma lectina através da análise de inibição da atividade hemaglutinante, utilizando diferentes tipos de carboidratos, que é verificada a especificidade de uma lectina (GABOR et al., 2001; OTTA et al., 2002).

No extrato bruto, podem estar presentes alguns agentes como taninos, lipídeos ou cátions divalentes que, em altas concentrações, podem dispersar eritrócitos resultando em uma falsa “impressão de atividade hemaglutinante” (RÜDIGER, 1998). Dessa forma, é necessário

o ensaio de inibição por carboidratos ou glicoproteínas para assegurar a presença de lectinas (YAMAGUCHI et al., 1998; KAWAGISHI et al., 2001; GOLDSTEIN et al., 2007; JAYATI et al., 2005). O ensaio de inibição precipitação com carboidratos, além de determinar a real presença de lectinas no meio, também revela a especificidade da lectina.

A caracterização de uma lectina se faz durante a purificação quanto à massa molecular, solubilidade, carga e afinidade específica de ligação a carboidratos (CORREIA e COELHO, 1995). Para conhecimento das propriedades básicas e funções biológicas das lectinas são de extrema importância sua purificação e caracterização (CARTWRIGHT et al., 2004).

A caracterização traz as informações para manutenção dessa proteína fora de seu meio biológico, além de trazer informações que ajudam a entender alguma ação biológica que a lectina apresente. Lectinas podem apresentar características diferentes e mesmo assim aplicabilidades bem semelhantes (HAMID et al., 2013).

Em um protocolo de purificação de lectinas são feitos extratos e destes é preciso determinar atividade hemaglutinante e concentração proteica. Em seguida, os extratos são ainda submetidos à purificação parcial por precipitação seletiva de proteínas com sais, onde sulfato de amônio é o sal mais comumente utilizado devido à sua elevada solubilidade em água. O sal por interagir mais com a água em competição as proteíneas remove a camada de solvatação das mesmas fazendo com que as se precipitem; posteriormente o material precipitado é dialisado através da utilização de uma membrana semipermeável (PAIVA e COELHO, 1992; COELHO e SILVA, 2000; PAIVA et al., 2011).

Em geral, depois de um fracionamento salino para purificação parcial e realizada diálise, são usadas técnicas de cromatografias que, em sua maioria são cromatografias de afinidades (GERLACH et al., 2002) de filtração em gel (REGO et al., 2002; SINGH et al., 2011), ou de troca iônica (NG e YU, 2001; SINGH et al., 2011).

Durante avaliação do grau de pureza e caracterização estrutural de uma lectina são usados métodos eletroforéticos (STRYER, 2004), sendo possível definir a massa molecular de subunidades a partir da desnaturação proteica na presença de detergente sulfato sódico de dodecila (SDS) (COELHO e SILVA, 2000; PAIVA et al., 2006), como também, a natureza glicoproteica através de coloração específica (FENG et al., 2006).

As lectinas devido sua diversidade possuem inúmeras ações biológicas e vêm sendo investigas em uma variedade de aplicações biológicas dentre elas capacidade de mucoadesão, citoadesão e citoinvasão; estas vêm sendo investigadas quanto à sua aplicação em sistemas de liberação de drogas (GABOR et al., 2004).

Entre outras aplicações, lectinas têm demonstrado um papel importante na área de microbiologia, pois demonstram ação contra o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de atividade contra fungos (DOM et al., 2008), pois são capazes de reconhecer sutis diferenças na estrutura de carboidratos complexos presentes na superfície celular de bactérias e fungos (LUO et al., 2007).

As lectinas devido afinidade por carboidratos nas superfícies de células podem ser usadas também para identificação de microrganismos, identificação da presença de carboidratos em biopolímeros ou glicoconjugados, cromatografia de afinidade para o isolamento de hormônios, neurotransmissores, imunoglobulinas e compostos relacionados; estudos relacionados à estrutura química de membranas biológicas; contribuição na elucidação da estrutura química dos determinantes de grupos sanguíneos ABO (GOLDSTEIN et al, 1980.; SHARON, 2008; CHE et al., 2011; WONG e CHAN, 2008).

2.1.1 Lectinas de plantas

Lectinas podem ser encontradas em todos os tecidos de planta como, por exemplo, folhas (COELHO e SILVA, 2000), cascas, bulbos, tubérculos (RÜDIGER e GABIUS., 2001), sementes (SHARMA et al., 2010), raízes (SOUZA et al., 2011), frutos, rizomas (PEUMANS et al., 2001) e cerne (SÁ et al., 2009).

As lectinas encontradas em plantas têm suas funções biológicas, ou seja, na planta, constantemente debatidas por terem uma diversidade estrutural muito ampla, pois diferem em vários aspectos como composição de aminoácidos, números de subunidades, estrutura terciária e massa molecular; sabe-se que tais aspectos das lectinas são determinantes quanto a sua especificidade por carboidratos; assim como também são estudadas sua ação ou aplicabilidade, fora do seu meio natural (SILVA, 2008; VAN DAME, 2014).

Desta forma, as lectinas vegetais apresentam diferentes propriedades bioquímicas, devido a inúmeras variedades de estruturas moleculares, assim no organismo da planta não se espera uma função para todas as lectinas de plantas, como também uma lectina pode ter mais de uma função (SANZ-APARICIO et al., 1997; RÜDIGER et al., 2000; INGALE E HIVRALE, 2013). Da mesma forma acontece fora de seu meio biológico, onde uma lectina pode apresenta diversas ações, assim como uma determinada ação biológica pode não se apresentar em mais de uma lectina.

Lectinas têm potencias funções biotecnológicas e biomédicas podendo ter aplicações em diferentes áreas do conhecimento (SANTOS et al., 2013), por terem propriedades atuantes em seu meio natural como na organização, regulação e sinalização celular (JIANG et al., 2006), armazenamento e transporte de carboidratos na manutenção e extensão da parede celular (SANTOS-MAGALHÃES et al, 2004), na ativação de enzimas (KESTWAL et al.,

2007) além de armazenamento ou transporte de carboidratos em sementes (SHARON e LIS, 2003; LAM e NG, 2011).

Estando fora desse meio biológico podem ser utilizadas para explorar a superfície de células como na mitose induzida, fagocitose, mecanismos de defesa (PEUMANS e VAN DAMME, 1995; SANTOS et al., 2013),

Lectinas podem ser aplicadas como mitogénicas, citotóxicas, antimicrobianas e também podem ser usadas como moléculas anti-proliferativas de células cancerosas. Estas proteínas podem ser úteis no tratamento de água, devido às suas propriedades coagulantes e anti-bacterianas. Lectinas também apresentam potencial inseticida com aplicação biotecnológica no controle de pragas agrícolas (SANTOS et al., 2013).

2.1.2 Gênero *Bauhinia*

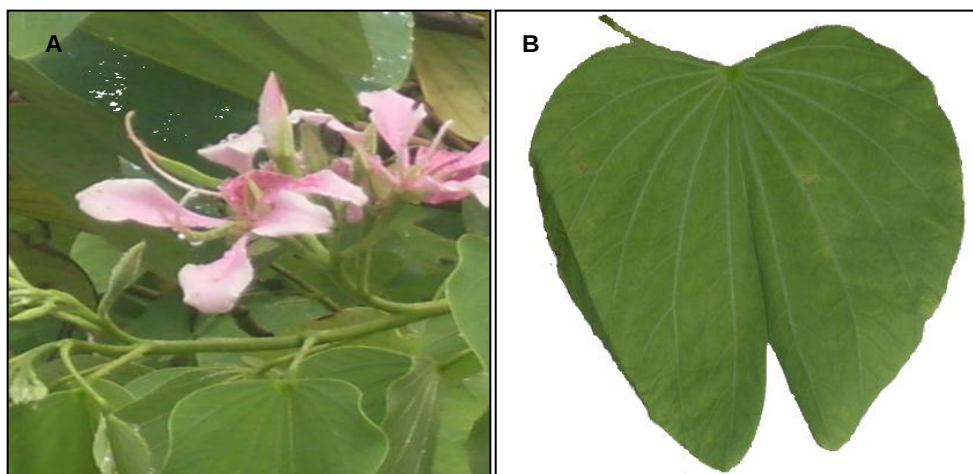
A Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que de toda população mundial certa de 80% ainda fazem uso de medicina popular, direcionados para cuidados primários de saúde, sendo atualmente os medicamentos fitoterápicos usados em todo o mundo (JORDAN et al., 2010; MINITERIO DA SAÚDE, 2012).

Desde a pré-história as plantas têm sido usadas como fontes de medicamentos, sendo que nas últimas quatro décadas tem havido um ressurgimento do interesse no estudo e utilização de medicamentos de plantas (ARAÚJO et al., 2011).

As plantas do gênero *Bauhinia* estão entre as plantas medicinais encontradas em várias regiões do mundo tais como África, Ásia bem como Américas Central e Sul. Pertencem à Família Fabaceae, sendo conhecidas como “pata-de-vaca” ou “unha-de-vaca” e utilizadas em forma de chás ou outras preparações para o tratamento de diabetes e outras enfermidades, como infecções e processos dolorosos (YEH et al., 2003; KHALIL et al., 2008, SILVA e

CECHINEL-FILHO, 2002). O gênero *Bauhinia* foi criado em 1753, por Carolus Linnaeus, em homenagem ao botânico franco-suíço Gaspar Bauhin e compreende cerca de 300 espécies (LEWIS, 1987). Na Figura 2 pode-se observar aspectos de *Bauhinia monandra*, sendo apresentado na imagem folhas e flores.

Figura 2. Aspectos de *Bauhinia monandra* (A: flores; B: folhas).



Fonte: Autoria Própria

Diversos estudos sobre plantas deste gênero sugerem inúmeras atividades biológicas como para extratos orgânicos de *Bauhinia variegata* que apresentaram atividade antibacteriana (PAREKH et al., 2006), Em outro estudo, extratos de *Bauhinia microstachya* demonstraram atividade antioxidante *in vitro* (BIANCO e SANTOS, 2010). Foi observado também que extratos alcoólico e aquoso de *B. variegata* podem diminuir os níveis plasmáticos de colesterol, triglicérides, LDL e VLDL e aumentam os níveis de HDL, além de demonstrar atividade antioxidante (RAJANI e ASHOK, 2009). Em outro estudo extrato aquoso de *Bauhinia forticata* apresentou atividade hipoglicemiante, reduzindo também níveis de triglicérides e colesterol em ratos diabéticos (LINO et al., 2004; CUNHA et al., 2010).

Estudos demonstraram que diante da atividade hipoglicemiante de *Bauhinia thoningii* houve uma diminuição no risco de doenças coronarianas causadas por complicações durante o *Diabetes mellitus*, em ratos com diabetes induzido por Aloxana (OJEZELE e ABATAN, 2011). A espécie *Bauhinia divaricata* teve atribuída sua atividade hipoglicemiante à sua capacidade de inibir a α -amilase por inibição da absorção de glicose pelo intestino (ANKLI et al., 2002). Em outro estudo também foi revelada atividade hipoglicemiante com o extrato aquoso da *Bauhinia megalandra* (GONZALES-MUJICA et al., 2003). Em humanos, pacientes que já faziam uso de algum medicamento para *Diabetes Mellitus* tipo 2, apresentaram diminuição dos níveis glicêmicos quando tratados com infusão de *B. forficata* em relação ao grupo controle (MORAES et al., 2010).

O extrato de *Bauhinia forficata* hidroetanólico quente a 70%, em ratos com diabetes induzido, apresentou um nível significativo de toxicidade o extrato não melhorou as variáveis fisiológicas nem metabólicas que são típicas alterações no diabético, além de produzir toxicidade hepática (PEPATO et al., 2010).

Estudos do extrato aquoso de *Bauhinia forficata* revelaram atividade antiedematogênica associada à ação analgésica periférica demonstrando fortes indícios de que estaria associada também com atividade anti-inflamatória (LUZ, 1995). Extratos hidroalcoólicos em acetato de etila (10 mg/kg) das folhas, caules, cascas e raízes de *Bauhinia splendens* demonstraram atividade analgésica, em modelo usado para indução de contorção abdominal por ácido acético (0,6%), sendo mais eficaz que aspirina e paracetamol, fármacos amplamente comercializados (WILLAIN et al., 1997).

Extratos de *Bauhinia guianensis* apresentaram atividade anti-inflamatória no modelo de edema de pata em ratos, induzido por carragenina, além de efeito analgésico no modelo de contorções abdominais induzido por ácido acético em camundongos (CARVALHO et al., 1999).

Na busca por compostos puros que apresentem as atividades vistas pela medicina popular, foi purificada uma Lectina (BbL) de *Bauhinia bauhinioides* que demonstrou atividade anti-inflamatória por métodos induzidos como edema de pata e peritonite; especula-se que BbL exerce atividade anti-inflamatória por interferir no caminho de sinalização que leva à síntese de citocinas, que, entre outras funções, estão envolvidas na amplificação da resposta inflamatória, incluindo o aumento da expressão das moléculas de adesão (BEZERRA, 2012).

Em outros estudos com as plantas do gênero *Bauhinia*, foi verificada atividade hemaglutinante na fração globulina das sementes de *B. malabarica* (VIDJAYA-KUMARI et al., 1993), *Bauhinia racemosa* e *Bauhinia vahlii* (RAJARAM e JANARDHANA, 1991), foi identificada uma lectina ligadora de N-acetil-D-galactosamina, nas sementes de *Bauhinia purpurea* (SARKER et al., 1993).

Em trabalhos recentes uma lectina de raízes secundárias de *Bauhinia monandra* (BmoRoL) apresentou atividades antifúngicas e termiticidal, contra espécies fitopatogênicas de *Fusarium* e foi mais ativo em *Fusarium solani* e termiticidal sobre os trabalhadores e soldados de *Nasutitermes corniger* (SOUZA et al., 2011).

Diante do uso da medicina popular há necessidade de pesquisa científica na busca de comprovação ou desmistificação de tais plantas, pois o uso por parte população de infusões ou outras preparações sem avaliação pode trazer riscos, por extratos de plantas terem em sua composição diversas substâncias que podem apresentar toxicidade. Também é preciso comprovar e identificar os compostos que apresentam as propriedades desejadas.

Extratos aquosos de folhas de *Bauhinia monandra* apresentaram propriedade hipoglicemiante em ratos (MENEZES et al., 2007), como também atividade antioxidante (ARGÔLO et al., 2004).

A Lectina (BmoLL, *B. monandra Leaf Lectin*), foi purificada das folhas de *Bauhinia monandra*, com afinidade por galactose específica, através de cromatografia de afinidade em gel de guar. Mais de 2 mg de BmoLL foram obtidas de 5 g de pó de folhas (COELHO e SILVA, 2000). Entre suas aplicações biológicas, BmoLL reconhece de forma seletiva os diferentes sorotipos de dengue, atribuí-se aos diferentes padrões de glicoproteínas nos soro produzidos pela resposta imune a partir de pacientes infectados pelo vírus do dengue (ANDRADE et al., 2011). BmoLL apresenta ação inseticida contra larvas de *Zabrotes subfasciatus* e *Anagasta kuehniella* (MACEDO et al., 2007). Em outro estudo BmoLL apresentou possível efeito antioxidante não apresentando genotoxicidade nem citotoxicidade em células e bactérias (SISENANDO et al., 2009).

2.2 Diabetes Mellitus

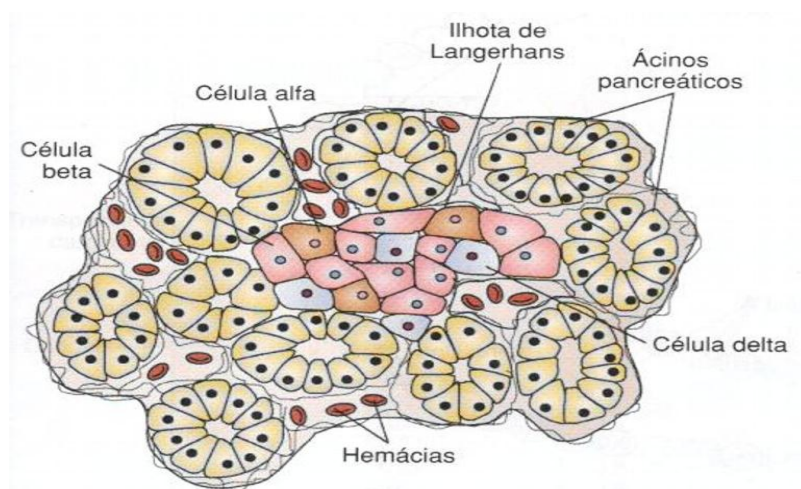
Em sua origem a palavra *Diabetes* vem de uma palavra grega que significa “poliúria”, sendo *Mellitus* derivado do latim que significa “mel” ou “doce”. Relatos dos sintomas foram descritos no primeiro século D.C., por Areteu da Capadócia quando descreve uma afecção crônica caracterizada por sede intensa, urina volumosa e adocicada (GOLDFINE e YOUNGREN, 1998; REZENDE, 2004; AIRES et al, 2008).

Em sua fisiologia normal para armazenamento energético o corpo utiliza glicose, ácidos graxos e outros, atuando o fígado e o pâncreas endócrino no controle destes suprimentos. Também para fins metabólicos, os sistemas respiratório e circulatório abastecem o organismo no fornecimento de oxigênio (COSTANZO, 2007).

Como mostrado na Figura 3, o pâncreas é constituído pelas ilhotas de Langerhans e os ácinos; a secreção de sucos digestivos no duodeno é feita através dos ácinos, enquanto as ilhotas de Langerhans secretam hormônios. As ilhotas são constituídas de células beta que

secretam insulina, células alfa que secretam glucagon além de células delta que secretam somatostatina. Em suas funções a insulina facilita o transporte da glicose na corrente sanguínea para os tecidos corporais, reduzindo assim os níveis de glicose no sangue, enquanto o glucagon aumenta a liberação de glicose armazenada no fígado para a corrente sanguínea. A somatostatina é responsável pela inibição da insulina e do glucagon, mantendo assim em um balanço energético (GUYTON e HALL, 2000; COSTANZO, 2007).

Figura 3. Ilhota de Langerhans no pâncreas



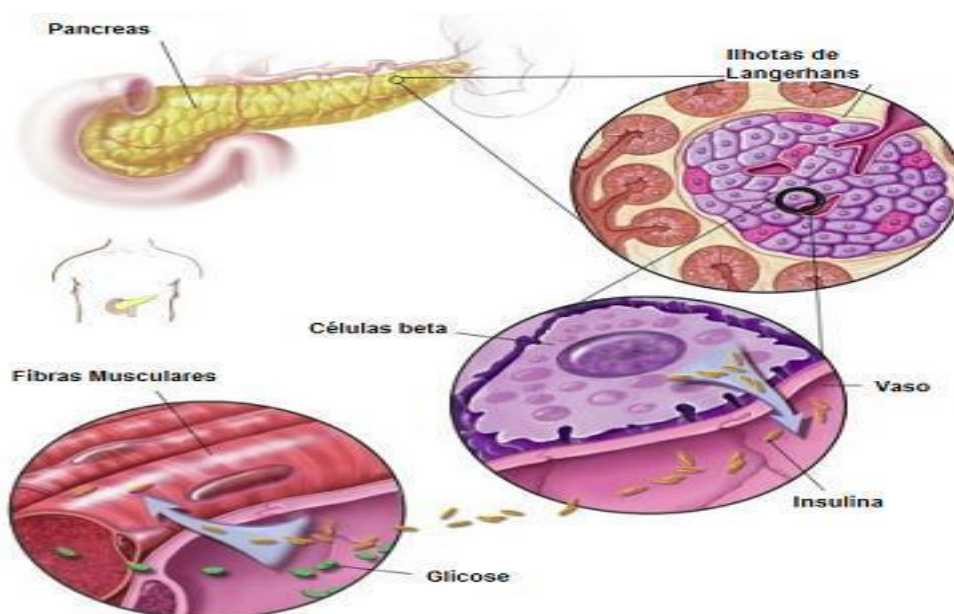
Fonte: (PORTH, 2007).

A secreção da insulina é aumentada em resposta ao aumento da concentração de glicose sanguínea, visando promover a entrada da glicose no espaço intracelular nos tecidos. Aproximadamente dois terços da insulina é liberada após uma refeição, depois os níveis de secreção baixam sendo mantidos, apenas em níveis considerados normais, ou seja, não diabéticos, sendo a glicose sanguínea entre 70mg/dl até 100mg/dl. É demonstrado na Figura 4 esse mecanismo (RANG et al., 2007).

Tecidos como cérebro e sistema nervoso usam quase exclusivamente a glicose como substrato energético, diferente de tecidos corporais como fígado ou músculos esqueléticos que

utilizam bastantes ácidos graxos como fonte de energia, caso haja um maior suprimento de glicose que o necessário ela passa a ser armazenada como glicogênio. Quando fígado e músculos saturam seus níveis de glicogênio, a glicose é convertida em ácidos graxos e armazenada como triglicerídeos nas células adiposas (COSTANZO, 2007).

Figura 4. Produção e ação da insulina no organismo humano.



Fonte: www.medicinapratica.com.br

A decomposição do glicogênio se dá entre as refeições quando os níveis de glicose baixam e ocorre a *glicogenólise*, caso precise o fígado pode sintetizar glicose a partir de outras moléculas energéticas e acontece então a gliconeogênese (NELSON e COX, 2011).

Diabetes Mellitus (DM) é caracterizado por ser um grupo de distúrbios metabólicos resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina que levam à hiperglicemia (FREGONESI et al, 2004). É classificado em quatro grandes tipos de acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA, 2009): *Diabetes Mellitus* tipo 1 (DM1), antes conhecido por insulino dependente; *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2), não insulino dependente;

Diabetes gestacional; e DM causado por alterações do metabolismo ou da homeostase da glicose devido a infecções, drogas, defeitos genéticos na função das células betas do pâncreas.

O DM1 e o DM2 são classificados de acordo com a sua etiologia e não mais como “insulina dependente” ou “não insulina dependente” (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2003). São os tipos mais encontrados, sendo o DM2 cerca de 90% dos casos (RIBEIRO et al; 2006). É visto que o DM1 é caracterizado por uma resposta imunológica, autoimune, de destruição das células-beta produtoras de insulina, ocorrendo frequentemente em jovens, em uma faixa etária de 0 a 15 anos e em alguns casos entre 40 a 50 anos (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2003; GOWER et al., 2009/2007). O DM2 está associado à obesidade e resistência à ação da insulina. Em muitos casos, não se faz necessário o uso de insulina exógena (OLIVEIRA e MILECH, 2004).

Em DM1, diante da ausência de insulina, ocorre mobilização exacerbada de ácidos graxos com lipólise para aumento da gliconeogênese hepática ocorrendo assim liberação de cetonas (PORTH, 2007). Desta forma a hiperglicemia com aumento de cetoácidos no metabolismo leva à cetoacidose diabética e consequências como perda de peso (GROSS et al., 2002; MIRANZI et al., 2008), além de promover estresse oxidativo induzindo formação de produtos de glicação e ativação da proteína quinase C (PKC) (NISHIKAWA et al, 2000).

No DM1 são decorrentes distúrbios nos balanços hídricos e eletrolíticos, uma vez que o aumento da glicose sanguínea leva também ao aumento da carga filtrada de glicose pelos rins, que excede a capacidade reabsorvida do túbulo proximal. A glicose não absorvida produz a diurese osmótica, poliúria e sede intensa (polidipsia). A poliúria pode causar hipotensão e a falta de insulina também provoca efluxo de K^+ , resultando em hipercalemia (BELL et al., 2010; WOLFSDORF et al., 2006; DUNGER et al., 2004; GIUGNO et al., 2005), Ocorre também aceleração no desenvolvimento da aterosclerose (ARONSON e

RAYFIELD, 2002). Dentre outras complicações é vista a neuropatia periférica, anormalidade sensório-motora em regiões periféricas do corpo abrangendo inúmeras manifestações em um conjunto de síndromes (GAGLIARDI, 2003; SCHEUERMANN-FREESTONE et al., 2003).

Estudos apontam alterações cardiovasculares, em diabéticos tais como macroangiopatias (grandes vasos) e microangiopatias (pequenos vasos) (HODGSON et al., 1990; RAHMAN et al., 2006), sendo a hipertensão associada à alteração da função e estrutura dos vasos, um considerável fator de risco cardiovascular (JOHNSTONE et al., 1993; COOPER et al., 2001; RAHMAN et al., 2006). Outras microangiopatias foram encontradas como a retinopatia que é conhecida como a causa mais frequente de cegueira (SOBREVIA e MANN, 1997; KLEIN, 2010). Alterações micro vasculares e macrovasculares estão associadas com mortalidade em DM1 (SHIVU et al., 2010).

Complicações decorrentes do *Diabetes Mellitus* que são comuns nas emergências médicas são coronariopatias, acidentes vasculares, doenças renais e amputações das extremidades inferiores (GUYTON e HALL, 2000; GAMBA et al., 2004; BORTOLETTO, 2010).

Dentre os portadores de DM1 a evolução clínica da doença é rápida, sendo necessário acompanhamento médico para diagnóstico o tratamento exige início precoce, oportunamente com insulina (ROCHA et al., 2002), incluindo cuidados com endocrinologista (RIBEIRO et al., 2006), visto também a possível necessidade de acompanhamento psicológico, diante da possibilidade de depressão (POUWER et al, 2010). Em crianças e adolescentes com DM1, a cetoacidose diabética é uma causa frequente de admissão em Emergências Hospitalares ou Unidades de Tratamento, sendo vista como principal causa de morte relacionada com edema cerebral (WOLFSDORF et al., 2006; DUNGER et al., 2004; LAWRENCE et al., 2005).

O diabetes representa um alto custo financeiro para a sociedade e para os sistemas de saúde, devido ao alto índice de mortalidade e incidência da doença. O Sistema Único de

Saúde (SUS), devido à demanda e os gastos para prevenção, diagnóstico e tratamento desenvolvem ações financiadas e executadas pelos gestores dos três níveis de governo: federal, estadual e municipal (DADOS ESTATÍSTICOS – DIABETES, 2011). Desde fevereiro de 2011 o Ministério da Saúde passou a oferecer medicamentos gratuitos para o tratamento do diabetes por meio da ação “Saúde Não Tem Preço”. Enquanto o “Plano de Ações para Enfrentamento de Doenças Crônicas Não Transmissíveis” onde prevê a implantação do programa Academia da Saúde, polos de atividade física abertos para a comunidade (MINISTERIO DA SAÚDE, 2011).

2.3 Camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*)

A linhagem NOD foi estabelecida a partir de uma raça com catarata (ICR), onde uma sublinhagem desenvolveu diabetes espontaneamente, por cruzamento entre irmãos. Essa linhagem inicialmente foi desenvolvida no Japão (KIKUTANI e MAKINO, 1992; MAKINO et al., 1980).

Figura 5. Camundongos NOD



Fonte: (ATKINSON e LEITER, 1999).

Os camundongos da linhagem NOD na Figura 5 desenvolvem uma autoimunidade, que causa diabetes através da destruição das células produtoras de insulina, semelhante à desenvolvida em humanos (KODAMA et al., 2003). Com a destruição de 95% das células beta produtoras de insulina, se manifesta o diabetes nos camundongos NOD (HERNANDORENA et al., 2001). Na incidência do diabetes espontâneo há uma variância entre 50 e 90% em fêmeas e 0 e 20% em machos, variando nas diversas colônias pelo mundo (KIKUTANI e MAKINO, 1992; BACH, 1994). A partir de colônias matrizes provenientes do Laboratório INSERM U-25 Neker, Paris, França, foi introduzida no Brasil a colônia da linhagem NOD, na Universidade Estadual de Campinas (PAVIN e ZOLLNER et al., 1994).

Atualmente como modelos experimentais, os camundongos NOD são estudados para compreensão de processos como sinalização de citocinas (SPOLSKI et al., 2008; GRINBERG-BLEYER et al., 2010; ABLAMUNITIS et al., 2012), antígenos específicos para as ilhotas de Langerhans (BENDING et al., 2009), processo inflamatório nas células betas pancreáticas (JAIN et al., 2008), efeitos da glicose na inflamação e vascularização das ilhotas de Langerhans e células betas (AKIRAV et al., 2011) como também genes que podem modular a suscetibilidade ao diabetes autoimune (CHEN et al., 2011). Tais fatores são determinantes para desenvolvimento de DM1. Os NOD são considerados bons modelos experimentais para diversas áreas pesquisas. Por desenvolverem espontaneamente DM1, são o modelo experimental que mais se aproxima do DM1 encontrado em humanos.

2.4 Testes Toxicológicos

A toxicologia tem por finalidade estudar os efeitos adversos de substâncias químicas sobre os organismos vivos, tendo por objetivo prevenir tais efeitos, estabelecendo padrões para o uso de tais substâncias. Uma determinada substância muito tóxica pode causar dano a

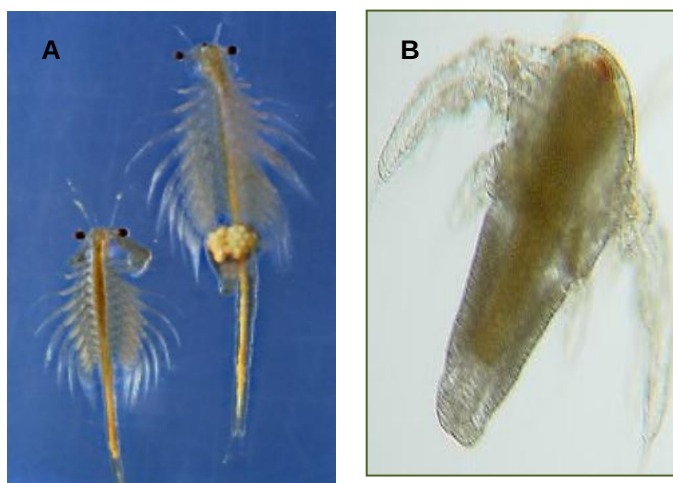
um organismo se for administrada em pequenas quantidades, mas uma substância que só causa dano em grande quantidade é considerada de baixa toxicidade (OGA, 2003).

Na determinação do nível de toxicidade de alguma substância, são usados os bioensaios que expõem organismos testes a determinadas concentrações da substância estudada, por um período de tempo também padrão, com o intuito de observar a ação da substância sobre as funções biológicas fundamentais do organismo teste (SILVA et al, 2002).

2.4.1 Bioensaio com *Artemia salina*

A *Artemia salina* é um invertebrado, classe Crustacea e família Artemiidae, que possui de 8 a 10 mm de comprimento Figura 7A, com quatro estágios de desenvolvimento sendo náuplio, metanáuplio, pré-adulto e adulto. Náuplios Figura 7B são larvas recém-eclodidas, não apresentam segmentos no corpo e ainda com reservas vitelinas como lipídeos e carboidratos (BARBIERI-JUNIOR e NETO, 2001).

Figura 6. Aspectos da *Artemia salina*: (A: adulto, B: Náuplio)



Fonte: www.bio-peixe.com

Os ovos da *Artemia salina* são encontrados em lojas de alimentos para peixes e outros crustáceos. Quando desidratados, são conservados por longos períodos, mas quando em contato com água salina eclodem entre 24-48 horas. Devido a esse ciclo de vida rápido, são utilizados para testes de toxicidade (ANDRIOLLI et al., 2007; LIMA et al., 2009).

Uma das formas de avaliar a toxicidade de substâncias é por meio do Bioensaio com *Artemia salina*, pois ele é simples, rápido e barato. Os testes de toxicidade frente à *Artemia salina* constituem uma ferramenta para análises preliminares, especialmente de compostos citotóxicos de extratos e produtos de origem natural. É possível determinar através desse método a concentração letal média (CL50) de substâncias e extratos em um meio salino (ALVES et al. 2000; ARAÚJO; CUNHA; VENEZIANI, 2010).

2.4.2 Avaliação da toxicidade oral

Avaliação da toxicidade oral aguda deve ser feita de acordo com *Guideline 423*. As Diretrizes da OCDE para a ensaios com produtos químicos são revistos periodicamente e buscam um acordo internacional sobre as normais de DL50 sobre a classificação de substâncias químicas (OECD, 2001). Os testes usam camundongos fêmeas ou machos, que são submetidos a jejum de 4h, suspenso apenas comida, não suspendendo água. São separados em gaiolas individuais e em geral e administrada dose inicial de 300mg/kg da substância estudada que solúvel em água é diluída em salina (0,9%) como veículo. Ainda de acordo com o *Guideline 423* (OECD, 2001) caso a substância não apresente toxicidade deverá ser administrada a dose 2000mg/Kg, mas caso apresente toxicidade, não será administrada a dose de 2000mg/Kg, mas doses de 50mg/Kg. Como a dose a ser administrada é líquida, não poderá ultrapassar 2mL/Kg do camundongo. Os camundongos são então observados individualmente, nas primeiras 4 h e depois periodicamente a cada 24 h, por 14 dias. As observações devem

incluir alterações na pele, pelo, olhos, mucosas, aparelho respiratório, aparelho circulatório, sistema nervoso autônomo e central, da atividade somatomotora e do comportamento. A atenção deve ser dirigida à observação de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Animais que são encontrados em estado moribundo e os animais que apresentarem dores violentas ou sinais de sofrimento intenso e continuado devem ser sacrificados sem dor. Quando os animais são mortos por razões humanitárias ou encontrado morto, no momento da morte deve ser registado com a maior precisão possível. Depois desse período de 14 dias são eutanasiados. Todas as observações devem ser registadas sistematicamente com registos individuais mantidos para cada animal. É obrigatório um grupo para controle negativo, que recebe apenas salina (0,9%), tendo permanência e observação igual ao grupo teste.

Para eutanásia após o término do tratamento, os animais devem ser submetidos ao uso de medicação pré-anestésica clorpromazina 50mg/kg (IM) e em seguida aplicado anestésico pentobarbital sódico 150mg/kg (IP) (MASSONE, 2008).

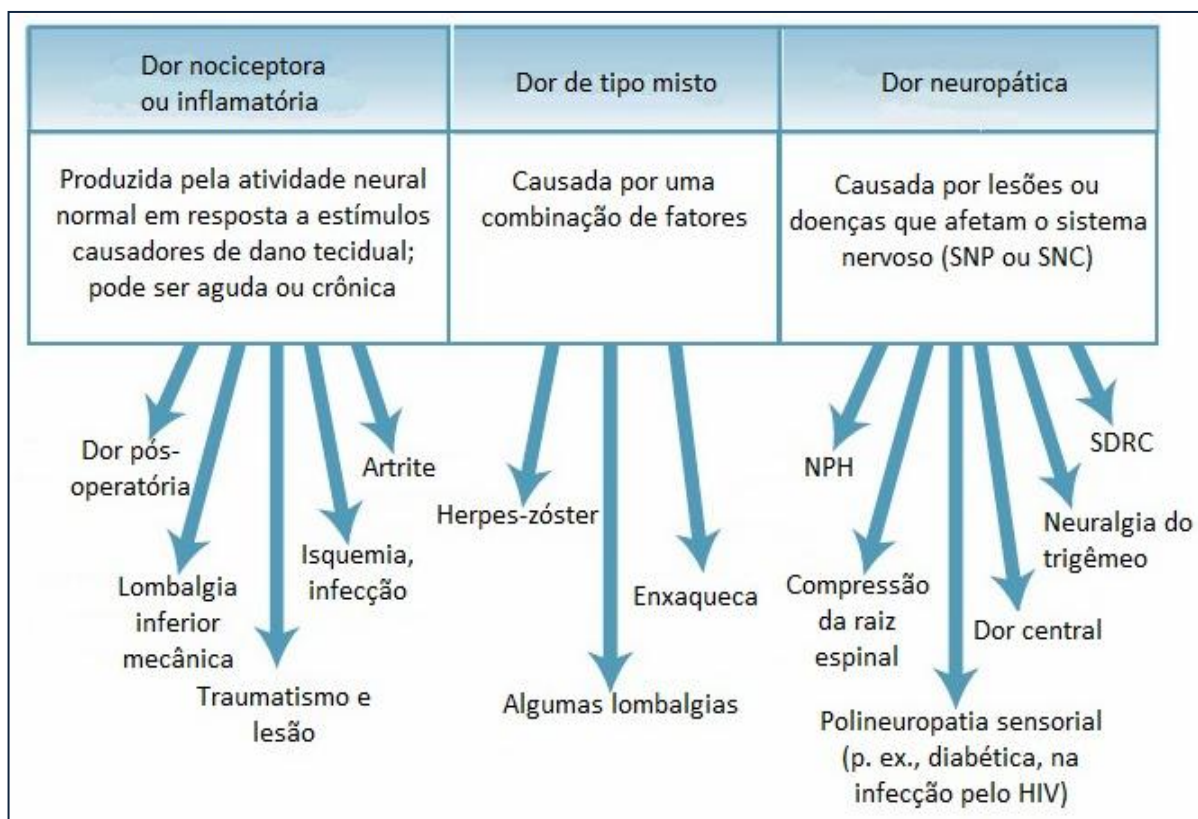
2.5 Dor e Inflamação

O conceito de Dor de acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2008), é “uma experiência sensorial e emocional desagradável, vinculada a uma lesão tecidual”. O sistema nervoso sensorial é especializado em detectar um estímulo externo e reagir a tal estímulo dentro das características de cada espécie (Figura 8). As proteínas transdutoras possibilitaram diferenciar o estímulo agressivo do inócuo, assim os receptores nervosos periféricos para a dor ampliam e facilitam a condução nervosa após estímulo de alto limiar, no intuito de manter as funções fisiológicas e preservar a vida (WALTERS, 1994).

Os nociceptores são estruturas específicas responsáveis pela detecção do estímulo nociceptivo periférico, localizados na porção distal dos neurônios aferentes primários, bastante distribuídos em vísceras, articulações, pele e vasos. São sensíveis a estímulos térmicos, mecânicos ou químicos (GARZÓN et al., 2009; ESPOSITO et al., 2010).

Dependente de fatores periféricos e centrais, a percepção a estímulos nocivos, assim como o limiar da dor para estimulação mecânica, diminuem muito em uma área de inflamação (aferências primárias estão sensibilizadas), como também em processos que envolvam hiperexcitabilidade de longa duração de neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal (WOOLFE e MACDONALD, 1944; CAUMO, LEVANDOVSKI e HIDALGO, 2009).

Figura 7. Conceitos de dor:



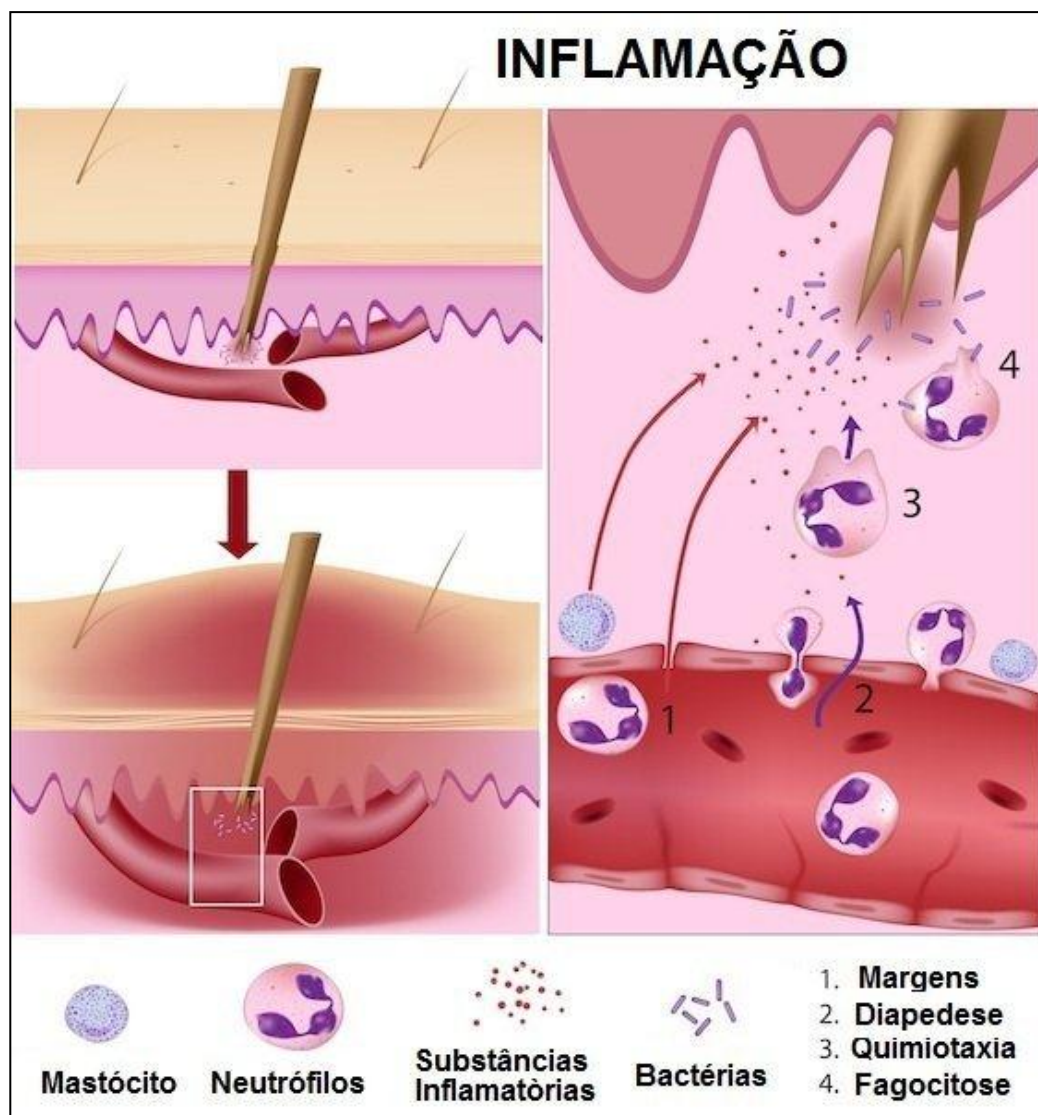
Fonte: (OAKLANDER, 2014).

Em geral, a dor aguda é vista como um caráter protetor, para manutenção da integridade do organismo, diferentemente da dor persistente que pode se torna crônica, não sendo mais considerada uma resposta adaptativa e passando a ser independente do estímulo que a gerou, podendo ser caracterizada como um processo de doença (CAUMO, LEVANDOVSKI e HIDALGO, 2009; POHL, et al., 2003).

A inflamação ou processo inflamatório é uma resposta de defesa do organismo a um agente agressor, tendo por objetivo promover a cura e ou reparo, sendo um processo regulado por fatores pro e anti-inflamatorios (ZALDIVAR et al., 2006). É coordenado por um amplo contingente de mediadores químicos capazes de agir no local da agressão ou sistemicamente. Além dos componentes celulares em particular, ainda há agentes originados do meio externo que também podem influenciar o processo inflamatório durante a cicatrização de ferimentos, como exemplo contaminação bacteriana, deficiências nutricionais e alterações hormonais. Fármacos são usados como adjuvantes no intuito de minimizar os efeitos deletérios do processo inflamatório e otimizar o reparo (MEDRADO et al., 2008).

Durante o processo inflamatório os agentes de defesa (Sistema imunológico) que atuarão contra o agressor são considerados próprios dos tecidos conjuntivos. Por depender dos vasos para chegar até as áreas agredidas, tais agentes efetores da inflamação fazem parte do exsudato e do infiltrado celular. O exsudato representa o conjunto de substâncias que extravasam pelas paredes dos vasos da microcirculação na área agredida, enquanto o infiltrado é o conjunto de células que chega até a área agredida por atravessar a parede das vênulas e capilares e se “infiltrar” nos espaços teciduais. São considerados componentes do exsudato inflamatório os mediadores de iniciação e manutenção dos fenômenos vasculares exsudativos, assim como, mediadores com ação direta sobre o agressor e mediadores para a manutenção da inflamação e atração dos leucócitos (CONSOLARO, 2009).

Figura 9. Aspectos do processo inflamatório



Fonte: <http://www.fisioterapiaparatodos.com>

Na presença de um agente agressor (Figura 9) e por consequência uma lesão, a partir da liberação dos mediadores inflamatórios, de forma sinérgica ocorre uma alteração no mecanismo de transdução periférica do estímulo nociceptivo. Esse mecanismo aumenta a sensibilidade de transdução dos nociceptores de elevado limiar, ocorrendo redução no limiar de percepção do estímulo doloroso, exagerada resposta a estímulos nociceptivos

supralimbiares, hiperalgesia, e dor espontânea (KRAYCHETE; CALASANS e VALENTE, 2006).

2.5.1 Analgésicos e Antiinflamatórios

A dor estar entre os sintomas que com maior frequência levam os pacientes à procura de médicos (CAVALCANTI e MADDALENA, 2003). Os recursos terapêuticos atuais permitem um controle da dor aguda, e certo alívio das dores crônicas (SIQUEIRA, 2015). Entre tais recursos estão os analgésicos, medicamentos com função de aliviar a dor, por bloqueio dos estímulos dolorosos antes de chegarem ao cérebro ou pela interferência na forma como o cérebro interpreta esses estímulos, sem levar a anestesia ou perda da consciência (desmaio) (GOODMAN e GILMAN, 2005.).

Medicamentos Analgésicos: Classicamente são divididos em dois grupos: os Analgésicos-Antiinflamatórios que são de ação periférica, como exemplo o ácido acetilsalicílico e os Opióides (ou Hipnoanalgésicos) com ação central podendo ocorrer depressão respiratória e dependência, como exemplo a morfina (CAVALCANTI e MADDALENA, 2003).

Medicamentos Antiinflamatórios: Tendo como função reduzir o grau de inflamação dos tecidos, são classificados basicamente em dois grupos: esteroidais e não-esteroidais. Os antiinflamatórios esteroidais (AIEs) incluem os corticóides e seus derivados. Os não-esteroidais (AINEs) ou silicilatos são os agentes analgésico-antipirético e antiinflamatório mais prescrito atualmente. Seu principal representante é o ácido acetilsalicílico que inibe a enzima ciclooxigenase 1 e 2 (GOODMAN e GILMAN, 2005).

A ciclooxigenase é uma enzima responsável pela clivagem do ácido araquidônico em uma das suas vias, formando as prostaglandinas que irão realizar diversas funções nos sistemas

orgânicos para o desencadeamento da reação inflamatória, existem duas ciclooxigenase: a COX-1 com ação fisiológica e a COX-2 com ação de aumentar a resposta inflamatória (GRANGEIRO et al, 2008).

A inibição da COX 1 (enzima constitutiva) não trás benefícios já que trata-se de uma enzima importante para a manutenção da homeostasia. O bloqueio da COX 2 (enzima induzida pela inflamação) em parte, trás benefícios ao paciente por evitar a formação das prostaglandinas, que tem por função aumentar a resposta inflamatória no organismo, com o bloqueio da COX 2 a resposta inflamatória passa a ser inibida. (FITZGERALD, 2004, GOODMAN e GILMAN, 2005.).

2.5.2 Testes antiinflamatórios e antinociceptivos:

Diante da busca por novas terapias para o tratamento de inflamação e dor se torna necessário o uso de modelos apropriados (SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1985). Modelos animais como os camundongos (*Mus musculus*) são usados atualmente em diversos testes para análise de atividade anti-inflamatória e antinociceptiva como exemplo: peritonite induzida por carragenina (HUI, 2014), edema de pata induzida por carragenina (FOTSO et al., 2014), contorção abdominal induzidas por ácido acético e método da placa quente (FOTSO et al., 2014).

Os testes feitos em animais assim como todo experimento científico precisa ter um planejamento experimental com critérios científicos e estatísticos, onde se faz necessário à existência de pelo menos dois grupos amostrais, um chamado grupo experimental, no qual se administra um fator da variável que se deseja saber a influência. O outro grupo, denominado controle será constituído de elementos que apresentem as características do grupo

experimental, menos a variável a ele aplicada (MINISTÉRIO DA JUSTIÇA DO BRASIL, 2015).

Trabalhos científicos *in vivo* para estudos de novas drogas anti-inflamatórias e/ou analgésicas avaliam seus grupos tratados com as drogas testes comparado-os com grupos controle, em geral são dois, um controle positivo no qual é administrada alguma droga já distribuída em mercado e outro grupo de controle negativo, ou seja, recebe algum placebo em geral soro fisiológico, salina 0,9% (CARVALHO et al., 1999; WILLAIN et al., 1997HUI, 2014).

2.5.2.1 Ensaio Anti-inflamatório: Peritonite induzida por carragenina

A peritonite consiste em inflamação do peritônio diante da presença de bactérias ou algum componente irritante que estimule a liberação de substâncias vasoativas, proteases celulares, endotoxinas e fixação pelo complemento com ativação do ácido aracdônico e em consequência, há ativação e agregação plaquetária. Ocorrendo a dilatação e aumento na permeabilidade microvascular com passagem de líquido, eletrólitos e proteínas do plasma para a cavidade abdominal (SWANN e HUGHES, 2000; PAPAOGLOU e RALLIS, 2001).

Sendo avaliado em camundongos (*Mus musculus*) no teste de Peritonite o nível da resposta imunológica junto a inflamação diante do agente flogístico, nessa caso carragenina, onde o Exsudato é coletado e ocorre contagem de leucócitos polimorfonucleares (PMN). O ensaio anti-inflamatório de peritonite induzido por carragenina é feito com os seguintes grupos: o de controle negativo que recebe placebo em geral solução salina (0,9%), o grupo para controle positivo que recebe a droga padrão ácido acetilsalicílico (100mg/kg) e os grupos para a droga teste em diferentes doses, em cada grupo). Os agentes são administrados através do peritoneu, onde irá agir o agente flogístico. Após 1 h, é injetada carragenina 0,25ml

(1% em solução salina) por via intraperitoneal, usada como um agente flogístico (GUPTA et al., 2005). Após 4 h, os animais são submetidos à inalação do anestésico Isoflurano com indução a 5% (MASSONE, 2008); posteriormente é feita eutanásia com deslocamento cervical imediatamente submetida à cirurgia para abertura abdominal. A cavidade peritoneal é lavada com 2ml de solução salina com EDTA. O Exsudato é coletado e a contagem de leucócitos polimorfonucleares (PMN) será determinada por *Cell Counter* (ABX MICROS 60) após diluição da amostra em Turk solução de (1:200) (GUPTA et al., 2005).

2.5.2.2 Ensaio Anti-inflamatório: Edema de pata

O teste de edema de pata ocorre devido à resposta inflamatória induzida pela carragenina é caracterizada com a formação de edema resultante da rápida produção de vários mediadores inflamatórios. A resposta inflamatória é bifásica sendo a fase inicial (60-90 minutos) que é atribuída a uma libertação de histamina, serotonina e bradicinina, enquanto a fase tardia (4-6 horas) é devido a super produção de prostaglandina (OGONOWSKI et al., 1997; MENDES et al., 2010). Esta resposta inflamatória é normalmente quantificada pelo aumento no tamanho da pata com a formação do edema, em geral a medição da pata é feita por paquímetro, sendo uma resposta modulada por inibidores de moléculas específicas dentro da cascata inflamatória, como os anti-inflamatórios não-esteroidais (MORRIS, 2003).

O teste consiste no edema da pata em camundongos (*Mus musculos*) que é induzido a partir de uma injeção subplantar de 0,1ml de carragenina (1%) em solução salina (0,9%) meia hora antes da administração das drogas (WINTER et al., 1962), Para todos os grupos, as administrações das drogas devem ser por via intraperitoneal, para melhor absorção. Nos grupos teste a substância a ser testada deve ser aplicada em diferentes doses formando mais de um grupos teste. O grupo de controlo positivo pode receber como droga padrão ácido

acetilsalicílico 100mg/kg. Os animais do controle negativo devem receber apenas a solução salina (0,9%). Com ajuda de um paquímetro a medição da pata deve ser feita a cada hora e esse acompanhamento do experimento segue por 4 h. Logo após esse período os animais devem ser eutanasiados. O resultado do teste é avaliado diante da atividade inibidora de inflamação da droga teste em comparação com a droga do grupo controle positivo e o placebo do grupo controle negativo é calculada a atividade inibidora usando uma fórmula padrão, que representa o período de pico de edema (WINTER et al., 1962). A porcentagem de inibição da inflamação é calculada usando a seguinte equação: inibição da inflamação (%) = [(Vf -Vi) significância grupo controle - (Vf -Vi) significância grupo de teste / (Vf -Vi) significância grupo controle] x 100 , onde Vf e Vi representam a espessura inicial e final da pata, respectivamente. Após o término do experimento os animais devem ser submetidos ao uso de medicação pré-anestésica clorpromazina 50 mg/kg (IM) e em seguida será aplicado anestésico pentobarbital sódico 150 mg/kg (IP) (MASSONE, 2008).

2.5.2.3 Atividade analgésica: Contorção abdominal

O teste de contorção abdominal um modelo químico de nocicepção que se baseia na contagem das contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores, como resposta reflexa à irritação peritoneal e à peritonite produzidas pela injeção intraperitoneal de uma solução de ácido acético 0,08% (WHITTLE, 1964). A injeção intraperitoneal do ácido acético provoca a liberação de uma variedade de mediadores, tais como a substância P, bradicininas, prostaglandinas, bem como das citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (PINHEIRO et al., 2011).

Nesse ensaio, os grupos são pré-tratados de forma intraperitoneal, para que ação do agente flogístico ocorra no abdome. O grupo da droga teste podendo ter como veículo salina

(0,9%); o grupo controle pode receber como droga padrão ácido acetilsalicílico 100mg/kg; o grupo controle negativo receberá apenas salina (0,9%). Após 1h, uma dose de 1ml de Ácido acético 1% deve ser injetado via intraperitoneal; após 10 minutos, o número de contorções durante o período seguinte de 20 min é contado e a porcentagem de inibição então calculada através da diminuição do número total de contorção nos grupos tratados em comparação com o grupo controle negativo.

Para eutanásia após o término do tratamento, os animais são submetidos ao uso de medicação pré-anestésica clorpromazina 50 mg/kg (IM) e em seguida aplicado anestésico pentobarbital sódico 150 mg/kg (IP) (MASSONE, 2008).

2.5.2.4 Atividade analgésica: Método da placa quente

O teste da placa quente (*hot plate*) utiliza a temperatura como estímulo nociceptivo, é citado como modelo específico para a detecção de substâncias analgésicas de efeito central, pois avalia o tempo em que os animais permanecem sobre uma chapa metálica aquecida ($55 \pm 0,5$ °C) até reagirem ao estímulo térmico com o comportamento de levantar ou lambear as patas (TITA et al., 2011). As aferições são realizadas nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das substâncias a serem analisadas. O modelo experimental foi inicialmente descrito por WOOLFE e MACDONALD (1944).

Apenas os analgésicos centrais que pela inibição do número de contrações provocadas por estímulos químicos que levam à dor, conseguem aumentar o tempo de resposta dos animais no teste da placa quente (JULIUS e BASBAUM, 2001; BENEDITO, 2009). A atividade analgésica frente a estímulos térmicos é assim estudada em camundongos utilizando o ensaio da placa quente (MACDONALD et al., 1946; TITA et al., 2011).

Os grupos são tratados de forma intraperitoneal. O grupo de controle negativo será tratado com salina (0,9%), o grupo controle positivo pode receber morfina (1mg/kg), como droga padrão, e o grupo teste a nova droga. O tratamento de todos os grupos deve ser uma hora antes da realização do experimento, permitindo assim absorção das drogas para que durante o procedimento os animais estejam sobre ação das drogas. Os camundongos são colocados individualmente em uma chapa quente aquecida à temperatura fixa de $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e o tempo de resposta ao estímulo é marcado por um temporizador. A permanência máxima do animal deverá ser de 60s, para evitar danos.

Após o término do tratamento, os animais são submetidos ao uso de medicação pré-anestésica clorpromazina 50 mg/kg (IM) e em seguida será aplicado anestésico pentobarbital sódico 150 mg/kg (IP) (MASSONE, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a lectina de folhas de *B. monandra* (BmoLL) quanto às atividades hipoglicemiante, anti-inflamatória e antinociceptiva e determinar sua toxicidade sobre camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) e nauplios de *Artemia salina*.

3.2 Objetivos Específicos:

- Estudar toxicidade de BmoLL em ensaio Artemicida e por Testes experimentais *in vivo* em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*).
- Investigar ensaio da atividade Anti-inflamatória de BmoLL em modelo de peritonite;
- Analisar atividade Anti-inflamatória de BmoLL em modelo de edema de pata;
- Avaliar atividade analgésica de BmoLL em modelo de contorção abdominal;
- Investigar atividade analgésica de BmoLL frente a estímulos térmicos (modelo de placa quente)
- Avaliar a atividade hipoglicemiante de BmoLL em camundongos NOD;

4 REFERÊNCIAS

ABLAMUNITTS, V.; HENEGARIU, O.; HANSEN, J.B.; OPARE-ADDO, L.; PRESTON-HURLBURT, P.; SANTAMARIA, P.; MANDRUP-POULSEN, T.; HEROLD, K.C. Synergistic Reversal of Type 1 Diabetes in NOD Mice With Anti-CD3 and Interleukin-1 Blockade: Evidence of Improved Immune Regulation. **Diabetes**. v. 61, p. 145-54, 2012.

AIRES, M.M. **Fisiologia / Margarida de Melo Aires**; colaboração de Ana Maria de Lauro Castrucci... [et al]. – 3º ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

AKIRAV, E.M.; LEBASTCHIA, J.; GALVANA, E.M.; HENEGARIUA, O.; AKIRAVB, M.; ABLAMUNITSA, V.; LIZARDIC, P.M.; HEROLDA, K.C. Herolda Detection of β cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 19018–19023, 2011.

ALVAREZ-MANILLA, G.; WARREN, N.L.; ATWOOD, J.; ORLANDO, R.; DALTON, S.; PIERCE, M. Glycoproteomic analysis of embryonic stem cells: identification of potential glycobiomarkers using lectin affinity chromatography of glycopeptides. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 2062–2075, 2010.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95. p 367-373. 2000.

AMBROSI, M.; CAMERON, N.; DAVIS, B. Lectins: Tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 3, p. 1593-608, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 32, p. S62–S67, 2009.

ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 278, p. 435–445, 2004.

ANDRADE, C.A.S.; OLIVEIRA, M.D.L.; MELO, C.P.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; NOGUEIRA, M.L.; SINGH, P.R.; ZENG, X. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic–inorganic nanocomposite and *Bauhinia monandra* lectin, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, p. 517–523, 2011.

ANDRIOLLI, A. C.; SANTOS, D. da S.; TEIXEIRA, S. C. G.; TEIXEIRA, L. R.; BERALDO, H.; ZIOLLI, R. L Avaliação do potencial citotóxico de 2-piridiniformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe(III) utilizando Artemia salina. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 8, n. 2, dez. 2007.

ANKLI, A.; HEINRICH, M.; BORK, P.; WOLFRAM, L.; BAUERFEIND, P.; BRUN, R.; CHMID, C.; WEISS, C.; BRUGGISSER, R.; GERTSCH, J.; WASESCHA, M.; STICHER, O. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. **Journal of Ethnopharmacology**., v. 79, p. 43-52, 2002.

ARAÚJO, M. G. F.; W. R. CUNHA & R. C. S. VENEZIANI. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 31, p. 205-209. 2010.

ARAÚJO, R.M.S; VAZ, A.F.M.; AGUIAR, J.S.; COELHO, L.C.B.B; PAIVA, P.M.G; MELO, A.M.M.; SILVA, T.G.; CORREIA, M.T.S. Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, antiinflammatory and analgesic activities. **Natural products and bioprospecting**. v.1, p 97–100, 2011.

ARGÔLO, A.C.C.M.; SANT'ANA, A. E.G.; PLETSCH, A. M.; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**. v. 95, p. 229-233, 2004.

ARONSON, D.; RAYFIELD, E.J. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. **Cardiovascular Diabetology**., v. 1, p .1-10, 2002.

ATKINSON, M.A.; LEITER , E.H.L. The NOD mouse model of type 1 diabetes: As good as it gets? **Nature Medicine**, v. 5, p. 601 – 604, 1999.

BACH H, MAKINO S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. **Advances in Immunology**, v. 51, p. 285-322, 1992.

BACH, J.F. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. **Endocrine Reviews**. v. 15, p. 516-42, 1994.

BARBIERE-JUNIOR, R. C.; NETO, A. O. Camarões Marinhos: Reprodução, Maturação e Larvicultura. **Editora Aprenda Fácil**, Viçosa – MG. V.1, 2001.

BATTISON, A.L.; SUMMERFIELD, .RL.; Isolation and partial characterisation of four novel plasma lectins from the American lobster *Homarus americanus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 198-204, 2009.

BELL, C.G.; TESCHENDORFF, A.E.; RAKYAN, V.K.; MAXWELL, A.P.; BECK, S.; SAVAGE, D. A. Genome-wide DNA methylation analysis for diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus. **BMC Med Genomics**. v. 3, p. 2-11, 2010.

BENDING, D.; DE LA PEÑA, H.; VELDHOEN, M.; PHILLIPS, J.M.; UYTENHOVE, C.; STOCKINGER, B.; COOKE, A. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 119, p. 565–572, 2009.

BENEDITO, R.B. **Efeito antinociceptivo do monoterpeno (S)-(-)-Álcool perílico em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2009.

BEZERRA, D. K. F. **Efeito Anti-Inflamatório da Lectina Isolada de Sementes de *Bauhinia bauhinioides* mart.** Fundação Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2012.

BIANCO, E. M.; SANTOS, C. A. M. Propriedades antioxidantes de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) J. F. Macbr. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, p. 238-241, 2010.

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

BORDE, V. SONWANE, B.; SONTAKKE, V.; SOMWANSI, B. Isolation and purification of alkaloids from medicinal plants by HPLC. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 31; p. 414-423, 2014.

BORTOLETTO, M.S.S.; VIUDE, D.F.; HADDAD, M.D.L.; KARINO, M.E. Caracterização dos portadores de diabetes submetidos à amputação de membros inferiores em Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Health Sciences**. v. 32, p. 205-213, 2010.

CARTWRIGHT JR, THARIA HA, BURNS I, SHRIVE AK, HOOLE D, GREENHOUGH TJ. Isolation and characterisation of pentraxin-like serum proteins from the common carp *Cyprinus carpio*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p.113-25, 2004.

CARVALHO, J.C.T.; SANTOS, L.S.; VIANA, E.P.; DE ALMEIDA, S.S.M.S.; MARCONATO, E.; RODRIGUES, M.; FERREIRA, L.R.; VAN DE KAMP, A. Anti-inflammatory and Analgesic Activities of the Crude Extracts from Stem Bark of *Bauhinia Guianensis*. **Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)** v. 37(4), p 281-284, 1999.

CARVALHO; J.S.B.; MARTINS, J D. L.; MENDONÇA; M.C.S.; LIMA, L. D. Uso Popular das Plantas Medicinais na Comunidade da Várzea, Garanhuns-PE. **Revista de Biologia Ciências Da Terra**, v.13. 2013

CAUMO W, LEVANDOVSKI R, HIDALGO MP. Preoperative anxiolytic effect of melatonin and clonidine on postoperative pain and morphine consumption in patients undergoing abdominal hysterectomy: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Journal of Pain**. v. 10, p. 100-108, 2009.

CAVALCANTI, I.L.;MADDALENA, M.L. **DOR**. Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro. Editores. Rio de Janeiro. 299 p. ; 21cm. ; ilustr. 2003.

CHE, A.-F., HUANG, X.-J. & XU, Z.-K. Polyacrylonitrile - base DNA no Fibrous Membrane with Glycosylated Surface for Lectin Affinity Adsorption. **Journal of Membrane Science**, Vol. 366, No. 1-2, pp. 272-277, 0376-7388, 2011.

CHEN, J.; GUSDON, A.M.; MATHEWS, C.E. Role of genetics in resistance to type 1 diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 27, p. 849-853, 2011.

COELHO, LCB; SILVA, MBR. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemistry Analysis**, v.11, p. 295-300, 2000.

COLWELL, J.A.; NESTO, R.W. The platelet in diabetes: focus on prevention of ischemic events. **Diabetes Care**. v. 26, p. 2181-2188, 2003.

COMINETTI, M.R.; MARQUES, M.R.F.; LORENZINI, D.M.; LOFGREN, S.E.; DAFFRE, S.; BARRACCO, M.A. Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 26, p. 715-721, 2002.

CONSOLARO, A. **Inflamação e Reparo**. 1. ed. Maringá: Dental Press, 19. 22 p. 2009.

COOPER, M. E.; BONNET, F.; OLDFIELD, M.; JANDELEIT-DAHME, K. Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. **American Journal of Hypertension**. v. 14, p. 475-486, 2001.

CORREIA, MTS; COELHO, LCB. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v, p. 261-273, 1995.

COSENZA G.P.; SOMAVILLA, N.; FAGG, C.W.; BRANDÃO, M.G.L.; Bitter plants used as substitute of Cinchona spp. (quina) in Brazilian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 790–796, 2013.

COSTANZO, L.S. 1947 – **Fisiologia**/Linda S. Costanzo; tradução de Vilma Ribeiro de Souza Varga – 3ªed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

CUNHA, A.M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A.G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M.W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine** v. 17, p. 37-41, 2010.

Dados Estatísticos – diabetes, 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1457 Acessado em: 21 nov. 2011

DEBRAY, H.; DECOUT, D.; STRECKER, G.; SPIK, G.; MONTREUIL, J. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycoproteins related to N-glycoproteins. **European Journal of Biochemistry**. v. 117, p. 41-55, 1981.

DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.; GADELHA, C.A.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; SOUZA, E.P.; NASCIMENTO, K.S.; FREIRE, V.N.; SAMPAIO, A.H.; AZEVEDO, W.F.; CAVADA, B.S. Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) bin complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. **Journal of Structural Biology** v. 154, p. 280–286, 2006.

DOM, Y.D.; FU, L.D.; JIA, Y.P.; DU, X.J.; WANG, Q.; WANG, Y.H.; ZHAO, X.F.; YU, X.Q.; WANG, J.X. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the *Chinese shrimp, Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 348-361, 2008.

DUNGER, D.B.; SPERLING, M.A.; ACERINI, C.L.; BOHN, D.J.; DANEMAN, D.; DANNE, T.P.A.; GLASE, N.S. European Society for Paediatric Endocrinology/Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society consensus statement on diabetic ketoacidosis in children and adolescents. **Pediatrics**. v. 113, p. 133-40, 2004.

EIDT, P.; Wit, E. A.; KOFER, J. F. A; BERTOLDO, S. Medicina Popular: Uma Tradição No Extremo-Oeste De Santa Catarina. **Unoesc & Ciência – ACHS**, Joaçaba, v. 4, n. 1, p. 55-64, jan./jun. 2013.

ESPOSITO E, PATERNITI I, MAZZON E, BRAMANTI P, CUZZOCREA S. Melatonin reduces hyperalgesia associated with inflammation. **Journal of Pineal Research**.; v. 49, p. 321–331, 2010.

FENG, K., Q.H. LIU, T.B. NG, H.Z. LIU AND J.Q. LI ET AL.; Isolation and characterization of a novel lectin from the mushroom *Armillaria luteo-virens*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 1573-1578, 2006.

FITZGERALD, G.A. Coxibs and cardiovascular disease. **The New Journal of Medicine**, v. 351, p. 1709-11, 2004.

FOTSO, A. F.; LONGO, F.; DJOMENI, P. D. D.; KOUAM, S. F.; SPITELLER, M.; DONGMO, A. B. SAVINEAU, J. P. Analgesic and antiinflammatory activities of the ethyl acetate fraction of *Bidens pilosa* (Asteraceae). **Inflammopharmacology**. v. 22, p. 105-114, 2014.

FREGONESI, C.E.P.T.; FARIA, C.R.S.; MOLINARI, S.L.; MIRANDA-NETO, M.H. Etiopatogenia da Neuropatia Diabética. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 8, 2004.

GABOR, F.; BOGNER, E.; WEISSENBOECK, A.; WIRTH, M. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 459-480, 2004.

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

GAGLIARDI, A.R.T. Neuropatia diabética periférica. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 02, p. 67-74, 2003.

GAMBA, M.A.; GOTLIEB, S.L.D.; BERGAMASCHI, D.P.; VIANNA, L.A.C. Amputações de extremidades inferiores por diabetes mellitus: estudo caso-controle. **Revista Saúde Pública**, v. 38, p. 399-404, 2004.

GARZÓN C, GUERRERO JM, ARAMBURU O, GUZMÁN T. Effect of melatonin administration on sleep, behavioral disorders and hypnotic drug discontinuation in the elderly: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Aging clinical and experimental research**. v. 21, p. 38–42 2009.

GERLACH, D.; WAGNER, M.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U. Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. **Federation of European Microbiology Societies Letters**, v. 214, p. 61-68, 2002.

GIUGNO, K.; MÜLLER, H.; BAGATINI, A. **Cetoacidose diabética**. (Editores: Piva, J.; Garcia, P.C.) Medicina intensiva em pediatria. Rio de Janeiro: Revinter; p. 349-61, 2005.

GOLDFINE, I.R.; YOUNGREN, J.F. Contributions of the *American Journal of Physiology* to the discovery of insulin. **American Journal of Physiology**, v. 274, p. 207-208, 1998.

GOLDSTEIN IJ, HUGHES RC, MONSIGNY M, OSAWA T, SHARON N. What should be called a lectin? **Nature**, p. 255-66, 1980

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

GONZALEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; MÁRQUEZ, A.H.; CAPOTE-ZULUETA, J. Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles. **Fitoterapia**, v. 74, p. 84-90, 2003.

GOWER, T. “HowStuffworks – **Causas da diabetes tipo 1**”. Publicado em 26 de fevereiro de 2007 (atualizado em 04 de fevereiro de 2009). Disponível em: <http://saude.hsw.uol.com.br/causas-diabetes-tipo-1.htm>. Acesso em: 20 jan. 2012.

GRINBERG-BLEYER, Y.; BAEYENS, A.; YOU, S.; ELHAGE, R.; FOURCADE, G.; GREGOIRE, S.; CAGNARD, N.; CARPENTIER, W.; TANG, O.; BLUESTONE, J.; CHATENAUD, L.; KLATZMANN D.; SALOMON, B.L.; PIAGGIO, E. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, p. 1819-1823, 2010.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S.P.; CAMARGO, J.L.; REICHELT, A.J.; AZEVEDO, M.J. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 16-26, 2002.

GOODMAN e GILMAN, **As Bases Farmacológicas da Terapêutica** / editores responsáveis, Joel G Hardman, Lee E. Limbird; editor – consultor, Alfred Goodman Gilman; [tradução da 10. ed. Original, Carla de Melo Vorsatz ...et al.; revisão técnica, Almir Lourenço da Fonseca]. Rio de Janeiro; McGraw-Hill, 2005.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; SAMBATHKUMAR, R.; GOMATHI, P.; RAJESHWAR, Y.; KAKOTI, B. B.; TAMIL SELVEN, V. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models. **Journal Ethnopharmacology**, v 98, p 267–273. 2005.

GUYTON, A.; HALL, J.E. **Medical physiology** – 10º ed. – Philadelphia: W.B. Saunders, p.884-898, 2000.

HERNANDORENA, B.H.; GONZALES, J.C.R.; GARCIA, J.C.R. Animales de Laboratorio en La Endocrinología: Biomodelos de la Diabetes Mellitus tipo 1. **Revista Cubana Endocrinología**, v. 12, p. 168-77, 2001.

HODGSON, W.C.; KING, R.G.; BOURA, A.L. Augmented potentiation of renal vasoconstrictor responses by TXA2 receptor stimulation in the alloxan diabetic rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 42, p. 423-427, 1990.

HUAI, W.; ZHAO, R.; SONG, H.; ZHAO, J.; ZHANG, L.; GAO, C.; HAN, L.; ZHAO, W. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates NLRP3 inflammasome activity by inhibiting NLRP3 transcription. **Nature Communications**. 2014.

INGALE, A.G.; HIVRALE, A.U. Plant as a plenteous reserve of lectin. **Plant Signal Behav.** v. 8, 2013.

JAIN, R.; TARTAR, D.M.; GREGG, R.K.; DIVEKAR, R.D.; BELL, J.J.; LEE, H.H.; YU, P.; ELLIS, J.S.; HOEMAN, C.M.; FRANKLIN, ZAGHOUBANI, H. Innocuous IFN γ induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, p. 207–218, 2008.

JAYATI, B.; ARUN, K.G.; BISHNU, P.C. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydrate Research**, v 340, p. 1973-1982, 2005.

JIANG, J-F; HAN, Y; XING, L-J; Y-Y; XU, Z-H; CHONG, K. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryza sativa*. **Toxicon**, v. 47, p. 133-9, 2006.

JOHNSTONE, M.T.; CREAGER, S.J.; SCALES, K.M.; CUSCO, J.A.; LEE, B.K.; CREAGER, M.A. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Circulation**, v. 88, p. 2510-2516, 1993

Jordan, S.A., Cunningham, D.G., Marles, R.J., Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, p.198–216, 2010.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature** 413(6852): 203 - 210, 2001.

KANIA, P.W.; SORENSEN, R.R.; KOCH, C.; BRANDT, J.; KLIEM, A.; VITVED, L.; HANSEN, S.; SKJODT, K. Evolutionary conservation of mannan-binding lectin (MBL) in bony fish: Identification, characterization and expression analysis of three bona fide collectin homologues of MBL in the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, p. 910-920, 2010.

KAWAGISHI H, TAKAGI J, TAIRA T, MURATA T, USUI T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycophthora aitchisonii*. **Phytochemistry**; v. 56, p. 53-8, 2001.

KENNEDY, J. F. PALVA, P.M.G.; CORELLA, M.T.S.; CAVALCANTI, M.S.M.; COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-30, 1995.

KESTWAL RM, KONOZY EHE, HSIAO C-D, ROQUE-BARREIRA MC, BHIDE SV. Characterization of α -mannosidase from *Erythrina indicaseeds* and influence of endogenous lectin on its activity. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1770, p. 24-28, 2007.

KHALIL, N.M.; PEPATO, M.T.; BRUNETTI, I.L. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.41, p. 165–171, 2008.

KILPATRICK, D. C. Review Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 187– 197, 2002.

KLEIN, R.; LEE, K.E.L.; GANGNON, R.E.; KLEIN, B.E.K. The 25-Year Incidence of Visual Impairment in Type 1 Diabetes Mellitus: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy, **Ophthalmology**, v. 117, p. 63-70, 2010.

KODAMA, S.; KÜHTREIBER, W.; FUJIMURA, S.; DALE, E.A.; FAUSTMAN, D.L. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. **Science**, v. 302, p. 1223-1227, 2003.

KRAYCHETE, D. C.; CALASAN, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor . **A Revista Brasileira de Reumatologia** . v. 46, nº 3, p. 199-206. 2006.

LAM, SK.; NG, TB. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89, p.45-55, 2010.

_____. Lectins: Production And Practical Applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 89, p. 45–55. 2011

LAWRENCE, A.; PHILLIPS, O.L.; ISMODES, R.A.; LOPEZ, M.; ROSE, S.; WOOD, D.; FARFAN, J.A. Local values for harvested forest plants in Madre de Dios, Peru: Towards a more contextualized interpretation of quantitative ethnobotanical data. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, p. 45-79, 2005.

LEWIS, G. P. Legumes of Bahia. **Royal Botanic Gardens**. p. 369, 1987.

LIMA, J.M., SILVA, C.A., ROSA, M.B., SANTOS, J.B., OLIVEIRA, T.G., SILVA, M.B. Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta Daninha**, Viçosa-MG. 27(1): 7-11, 2009.

LINO, C.D.; DIOGENES, J.P.L.; PEREIRA, B.A.; FARIA, R.A.P.G.; NETO, M.A.; ALVES, R.S.; QUEIROZ, M.G.R.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 125-127, 2004.

LUO, Y., XU, X., LIU, J., LI, J., SUN, Y., LIU, Z., LIU, J., VAN DAMME, E., BALZARINI, J., BAO, J., A novel mannose-binding tuber lectin from *Typhonium*

divaricatum (L.) Decne (family *Araceae*) with antiviral activity against HSV-II and anti-proliferative effect on human cancer cell lines. **Journal Biochemistry and Molecular Biology**. v. 40, p.358-367, 2007.

LUZ, M. M. S.; Monografia de Especialização em Ciências Farmacêuticas, **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, Brasil, 1995.

MACDONALD, A.D.; WOOLFE, G.; BERGEL, F.; MORRISON, A.L.; PAROLI, E.; RINDERKNECHT, H. Analgesic action of pethidine and related compounds. **British Journal of Pharmacology**, v. 1, p. 4-14, 1946.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; SILVA, M.B.R.; COELHO, L.C.B.B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 146, p. 486-498, 2007.

MAKINO S, KUNIMOTO K, MURAOKA Y, MIZUSHIMA Y, KATAGIRI K, TOCHINO Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Jikken Dobutsu**. v. 29, p.1-13, 1980.

MASSONE, F. Anestesiologia veterinária: farmacologia e Técnicas: Texto e Atlas colorido. 5ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, p 104-105, 2008.

MEDRADO, A.P., SOARES, A.P., SANTOS, E.T., REIS, S.R., ANDRADE, Z. A. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. **The Journal of Photochemistry and Photobiology B**, Lausanne, v. 92, n. 3, p. 144-52, Sept. 2008.

MENDES, S.S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391-397, 2010.

MENEZES, F.S.; MINTO, A.B.M; RUELA, H.S.; KUSTER, R.M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy)**, v. 17, p. 8-13, 2007.

MINISTÉRIO DA JUSTIÇA DO BRASIL, 2015 – Disponível em: <http://www.obid.senad.gov.br>. Acessado em 20/01/2015.

MINISTERIO DA SAÚDE, 2011 – Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022. Publicado em Brasília: Ministério da Saúde; 2011. Acessado em 28/01/15. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_acoes_enfrent_dcnt_2011.pdf.

_____. **Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica**. Publicado em Brasília: Ministério da Saúde; 2012. Acessado em 15/01/2015. Disponível em: http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/geral/miolo_CAP_31.pdf

MIRANZI, S.S.C.; FERREIRA, F.S.; IWAMOTO, H.H.; PEREIRA, A.G.; MIRANZI, M.A.S. Qualidade de vida de indivíduos com diabetes mellitus e hipertensão acompanhados

por uma equipe de saúde da família. **Texto e contexto – Enfermagem**, v. 17, p. 672-679, 2008.

MO, H., WINTER, H. C. AND GOLDESTINE, I. J. Purification and characterization of a Neu5Ac a 2–6 Gal b-1–4 Glc/GlcNac–specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10623–29, 2000.

MORAES, E.A.; REMPEL, C.; PÉRICO, E.; STROHSCHOEN, A.A.G. Avaliação do perfil glicêmico de portadores de Diabetes Mellitus tipo II em UBSs que utilizam infusão de folhas de *Bauhinia forficata* Link, **ConScientiae Saúde**, v.9, p. 569-574, 2010.

MORRIS, C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. Methods in **Molecular Biology**, v. 225, p. 115-121, 2003.

MOURE A, SINEIRO J, DOMÍNGUEZ H. Extraction and functionality of membrane-concentrated protein from defatted *Rosa rubiginosa* seeds. **Food Chemistry**; v. 74, p. 327-39, 2001.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**; tradução de Fabiana Horn; revisão técnica de Carla Dalmaz e Sandra Estrazulas Farias – 5ªed.– Porto Alegre: Artmed, 2011.

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

NG, T.B., YU, Y.L. Isolation of a novel heterodimeric agglutinin from rhizomes of *Smilax glabra*, the Chinese medicinal material tufuling. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 269-77, 2001.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; DU, X.L.; YAMAGISHI, S.; MATSUMURA, T.; KANEDA, Y.; YOREK, M.A.; BEEBE, D.; OATES, P.J.; HAMMES, H.P.; GIARDINO, I.; BROWNLEE, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**. v. 13, p. 787-90, 2000.

NUNES, E.S.; SOUZA, M.A.A.; VAZ, A.F.M.; SANTANA, G.M.S.; GOMES, F.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G.; SILVA, R.M.L.; LUCCA, R.A.S.; OLIVA, M.L.V.; GUARNIERI, M.C.G.; CORREIA, M.T.S. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v. 159, p. 57–63, 2011.

OAKLANDER, 2014. Disponível em: http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/5249/dor_cronica_%E2%80%93anne_louise_oaklander.htm. Acessado em: 12/12/2014.

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development, *OECD Guideline for Testing of Chemicals. Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method*, 14, 2001.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.

OGONOWSKI, A.A.; MAY, S. W.; MOORE, A.B.; BARRETT, L. T.; O'BRVANT, C. L.; POLLOCK, S. H. Anti-inflammatory and analgesic activity of an inhibitor of neuropeptide amidation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, p. 846-853, 1997.

OJEZELE, M.O.; ABATAN, O.M. Hypoglycaemic and coronary risk index lowering effects of *Bauhinia thonin* in alloxan induced diabetic rats. **African Health Sciences**. v. 11, p. 85-89, 2011.

OLIVEIRA, J.E.P.; MILECH, A. **Diabetes mellitus: clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Atheneu, 2004.

ORDAN, L., Kroll, D. Herbs as medicines. **Archives of Internal Medicine** v. 158, p. 2192-2199, 1998.

OSHIKAWA K, AOKI K, YOSHINO Y, TERADA S. Purification and characterization of a basic amino acid-specific peptidase from seeds of jack bean (*Canavalia ensiformis*). **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, v. 64, p. 2186-92, 2000.

OTTA, Y.; AMANO, K.; NISHIYAMA, K.; ANDO, A.; OGAWA, S.; NAGATA, Y. Purification and properties of a lectin from ascomycete mushroom, *Ciborinia camelliae*. **Phytochemistry**, v. 60, p. 103-107, 2002.

PAIVA, P.M.G.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: MÉNDEZ-VILLAS, A. (ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A. Editora: Formatex Research Center, Badajoz. 2010.

PAIVA, P. M. G., OLIVA, M.L.; FRITZ, H.; COELHO, L.C.; SAMPAIO, C.A. Purification and primary structure determination of two Bowman-Birk type trypsin isoinhibitors from *Cratylia mollis* seeds. **Phytochemistry**, v. 67, n. 6, p. 545-552, 2006.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113-118, 1992.

PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; COELHO, L. C. B. B. **Insecticide activity of lectins and secondary metabolites**. In: Perveen, F. (Org.). Insecticides - Advances in Integrated Pest Management. Rijeka: InTech, p. 579-598, 2011.

PAPAZOGLU, L.G.; RALLIS, T. Diagnosis and surgical management of septic peritonitis in the dog and cat. **Waltham Focus**, Leicestershire, v.11, n.2, p.9-14, 2001.

PAREKH, J.; KARATHIA, N.; CHANDA, S. "Evaluation of Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of *Bauhinia variegata* L bark". **African Journal of Biomedical Research**. v. 09, p. 53-56, 2006.

PAVIN, E.J.; ZOLLNER, R.L. Implantação da linhagem "NOD-mice (camundongos diabéticos não-obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimunes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 38, p. 105-108, 1994.

PEPATO, MT; CONCEIÇÃO, CQ; GUTIERRES, VO; VENDRAMINI, RC; SOUZA, CRF; OLIVEIRA, WP; BRUNETT, IL. Evaluation of the spouted bed dried leaf extract of *Bauhinia forficata* for the treatment of experimental diabetes in rats. **African Journal of Biotechnology**, v.9, p. 7165-7173, 2010.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant Lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Hants, v. 15, p. 199-227, 1998.

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

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.; BARRE, A.; ROUGE, P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 491, p. 27-54, 2001.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.; BARRE, A.; ROUGE, P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 491, p. 27-54, 2001.

PINHEIRO B, SILVA A, SOUZA G, FIGUEIREDO J, CUNHA F, LAHLOU S, DA SILVA JK, MAIA JG, SOUSA PJ. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **J Ethnopharmacol** 188: 479–486, 2011.

POHL, M., MEUNIER, A., HAMON, M. Gene Therapy of Chronic Pain. Current Gene Therapy. **BRAZ J.** v. 3, p.223-238, 2003.

PORTH, C. M. **Essentials of pathophysiology**: Concepts of altered health states. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

POUWER, F.; GEELHOED-DUIJVESTIJN, P. H. L. M.; TACK, C. J.; BAZELMANS–, A.-J. BEEKMAN, E.; HEINE, R. J.; SNOEK, F. J. Original Article: Education and Psychological Aspects Prevalence of comorbid depression is high in out-patients with Type 1 or Type 2 diabetes mellitus. Results from three out-patient clinics in the Netherlands. **Diabetic Medicine**, v. 27, p. 217–224, 2010.

RAHMAN, S.; RAHMAN, T.; ISMAIL, A. A1-S.; RASHID, A.R.A. Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 09, p. 767-80, 2006.

RAJANI, G.P.; ASHOK, P. *In vitro* antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Bauhinia variegata* Linn. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 41, p. 227-232, 2009.

RAJARAM, N.; JANARDHANAN, K. Chemical composition and nutritional potential of the tribal pulses *Bauhinia purpurea*, *B. racemosa* and *B. vahlii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 55 p. 423-431, 1991.

RANG, H.P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang e Dale Pharmacology**; tradução de Raimundo Rodrigues Santos e outros – 6ªed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REGO E.J., DE CARVALHO DD, MARANGONI S, DE OLIVEIRA B, NOVELLO JC. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry**. v. 60, p. 441-446, 2002.

REZENDE, J.M. **Linguagem Médica – Diabetes**. Linguagem Médica. 3 ed. Goiânia: AB Editora e Distribuidora de Livros Ltda, 2004.

RIBEIRO, F.F.; MARIOSIA, L.S.; FERREIRA, S.R.G.; ZANELLA, M.T. Visceral fat and metabolic syndrome: more than a simples association. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 230-238, 2006.

ROCHA, J.L.L.; BAGGIO, H.C.C.; CUNHA, C.A.; NICLEWICZ, E.A.; LEITE, S.A.O.; BAPTISTA, M.I.D.K. Aspectos Relevantes da Interface Entre Diabetes Mellitus e Infecção. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, p.221-229, 2002.

RÜDIGER, H. Plant letins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functional of plants lectins. **Acta Anatomia**. v. 161, p. 130-52, 1998.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. Plant lectin: Ocurrance, biochemistry, functions and applications. **Glicoconjugates Journal**, v. 18, p. 589-613, 2001.

RÜDIGER, H.; SIEBERT, H-C.; SOLÍS, D.; BARBERO, J.J.; ROMERO, A.; LIETH, C.W.; MAURIÑO, T.D.; GABIUS, H-J. Medicinal Chemistry Based on the Sugar Code: Fundamentals of Lectinology and Experimental Strategies with Lectins as targets. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 389-416, 2000.

SÁ, R.A.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, N.D.L.; MELO, C.M.L.; GUSMÃO, N.B.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G.; BIEBER L.W. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science and Technology**, v. 43, p. 85-95, 2009.

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A. A.; ARAGÃO, K. S.; ARAGÃO, K. S.; OLIVEIRA, C. C.; MOTA, M. R. L.; GOMES, R. C.; PIRES, A. F.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; ALENCAR, N. M. N.; CRIDDLE, D. N.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p. 1050–1055, 2006.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; CESAR A.S. A.; MARIA T.S.C.; LUANA C.B.B.C.; SILENE C.N. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 435–445, 2004.

SANZ-APARICIO, J. HERMOSO J.; GRANJEIRO TB., CALVETTE JJ.; Cavada BS. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters** v. 405, p. 114-118, 1997.

SARKER, A.B.; KOIRALA, T.R.; MURAKAMI, I. *Bauhinia purpurea* agglutinin (BPA) binding sites in human gastrointestinal tract. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 37, p. 21-28, 1993.

SCHEUERMANN-FREESTONE, M.; MADSEN, P.L.; MANNERS, D.; BLAMIRE, A.M.; BUCKINGHAM, R.E.; STYLES, P.; RADDA, G.K.; NEUBAUER, S.; CLARKE, K. Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. **Circulation**, v. 107, p.3040-3046, 2003.

SEDGWICK, D.; WILLOUGHBY, D.A. Initiation of inflammatory response and its prevention. Em: BONTA, I.L., BRAY, M.A. & PARNHAM, M.J. Handbook of Inflammation. **Elsevier**. v. 5, p. 25-47, 1985.

SHARMA, A.; WONG, J.H.; LIN, P.; CHAN, Y.S.; NG, T.B. Purification and Characterization of a Lectin from the Indian Cultivar of French Bean Seeds, **Protein & Peptide Letters**, v. 17, p. 221-227, 2010.

SHARON, N. Lectins: past, present and future. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, p. 1457–1460, 2008.

_____. Trends Biochemical. **Science**, v. 18, p. 221-226, 1993.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. v. 14, p. 53-62, 2004.

_____. **Lectins**, – 2^aed. – Kluwer Scientific Publishers, Amsterdam, 2003.

SHIVU, G. N.; PHAN, T.T.; ABOZGUIA, K.; AHMED, I.; WAGENMAKERS, A.; HENNING, A.; NARENDHAN, P.; STEVENS, M.; FRENNEAUX, M. Relationship Between Coronary Microvascular Dysfunction and Cardiac Energetics Impairment in Type 1 *Diabetes Mellitus*. **Circulation**. v. 121, p. 1209-1215, 2010.

SILVA, C. D. C.; CORIOLANO, M.C.; LINO, M.A.S.; MELO, C.M.L.; BEZERRA, R.S.; CARVALHO, E.V.M.M.; SANTOS, A.J.G.; PEREIRA, V.R.A.; COELHO, L.C.B.B. Recognition Lectin from *Oreochromis niloticus* (Tilapia Fish): Cytokine Production in Mice Splenocytes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 424-35, 2012.

SILVA, KL; CECHINEL FILHO, V; Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, p. 449–454, 2002.

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

SILVA, R.V.; NAVICKIENE, H. M. D.; KATO, M.J. BOLZANI, V. S.; MEDA, C.I.; YOUNG M. C. M. et al. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**: v.59, p.521-27. 2002.

SINGH, R.S.; BHARI, R.; SINGH, J.; TIWARY, A.K. Purification and characterization of a mucin-binding mycelial lectin from *Aspergillus nidulans* with potent mitogenic activity, **World J Microbiol Biotechnol**, v. 27, p. 547–554, 2011.

SIQUEIRA, J.T. T. Porque a Dor é uma questão também de Saúde Pública! **Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor**. Disponível em: <http://www.dor.org.br/publico/noticias>. Acessado em 28/01/2015.

SISENANDO, H.A.A.A.C.N.; MACEDO, M.F.S.; SATURNINI, A.C.R.D.; COELHO, L.C.B.B.; MEDEIROS, S.R.B. Evaluation of the genotoxic potential of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 303-308, 2009.

SOBREVIA, L.; MANN, G.E. Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 423-452, 1997.

SOUZA, J.D.; SILVA, M.B.R.; ARGOLO, A.C.C.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S., PAIVA, P.M.G.; SILVA, M.D.C.; COELHO, L.C.B.B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation** v. 65 p. 696-702, 2011.

SOUZA, J.D.; SILVA, M.B.R.; ARGOLO, A.C.C.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S., PAIVA, P.M.G.; SILVA, M.D.C.; COELHO, L.C.B.B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation** v. 65 p. 696-702, 2011.

SPOLSKI, R.; KASHYAP, M.; ROBINSON, C.; YU, Z.; LEONARD, W.J. IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse, **PNAS**, v. 105, p. 14028–14033, 2008.

STRYER, L. **Bioquímica**, Rio de Janeiro, Guanabara Kooagan. 2004.

SWANN, H.; HUGHES, D. Diagnosis and management of the peritoneal cavity. **Veterinary Clinics of North America:Small Animal Practice**, Philadelphia, v.30, n.3, p.603-615, 2000.

THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**; v. 26, p. 5-20, 2003.

TITA B, ABDEL-HAQ H, VITALONE A, MAZZANTI G, SASO L. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. **Farmaco** v. 56, p. 341-343, 2011.

TOFIGHI, Z.; MOLAZEM, M.; DOOSTDAR, B., TABANB, P.; SHAHVERDI, A. R.; SAMADI, N. YASSA, N. Antimicrobial Activities of Three Medicinal Plants and Investigation of Flavonoids of *Tripleurospermum disciforme*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14; p. 225-231, 2015.

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

UNGER, D.B.; SPERLING, M.A.; ACERINI, C.L.; BOHN, D.J.; DANEMAN, D.; DANNE, T.P.A.; GLASE, N.S. European Society for Paediatric Endocrinology/Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society consensus statement on diabetic ketoacidosis in children and adolescents. **Pediatrics**. v. 113, p. 133-40, 2004.

VAN DAMME, E. J. M; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. 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. 575-592, 1998

VAN DAMME, E.J. History of plant lectin research. History of plant lectin research. **Methods in Molecular Biology**. p. 1200:3-132014, 2014.

VIDJAYA-KUMARI, K.; SIDDHURAJU, P.; JANARDHANAN, K. Chemical composition and nutritional potential of the tribal pulse (*Bauhinia malabarica* Roxb). **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 44, p. 291-298, 1993.

WALTERS, E.T. Injury-related behavior and neuronal plasticity: An evolutionary perspective on sensitization, hyperalgesia and analgesia. **International Review of Neurobiology** 36: 325-427, 1994.

WANG, Y.; NANGIA-MAKKER, P.; TAIT, L.; BALAN, V.; HOGAN, V.; PIENTA, K.J.; RAZ, A. Regulation of prostate cancer progression by galectin-3. **The American Journal of Pathology**, v. 174, p. 1515-23, 2009.

WHITTLE, B.A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **Journal Neuropharmacol** 3: 369 – 378, 1964.

WILLAIN FILHO, A.; BREVIGLIERI, E.; CECHINEL FILHO, V.; SANTOS A.R.S.; Antinociceptive Effect of the Hydroalcoholic Extract of *Bauhinia splendens* Stems in Mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 49, p. 823-827, 1997.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edemas in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. V. 111, p. 544-547, 1962.

WOLFSDORF, J.; GLASER, N.; SPERLING, M.A. Diabetic ketoacidosis in infants, children, and adolescents: A consensus statement from the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 29, p. 1150-1109, 2006.

WONG, J. H; CHAN, H Y E. A mannose/glucose-specific lectin from Chinese evergreen chinkapin (*Castanopsis chinensis*) **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 1017-1022, 2008.

WOOLFE G, MACDONALD AD. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.80, p.300–307, 1944.

WU, J. H.; SINGH, T.; HERP, A.; WU, A. M. Carbohydrate recognition factors of the lectin domains present in the *Ricinus communis* toxic protein (ricin). **Biochimie**, V. 88, N. 2, P. 201-217, 2006.

YAMAGUCHI, M; JIMBO, M; SAKAI, R; MURAMOTO, K; KAMIYA, H. Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (Freshwater cyanobacterium lectin). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 119, p. 593-597, 1998.

YAN, Q.; ZHU, L.; KUMAR, N.; JIANG, Z.; HUANG, L. Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with anti-proliferative activity. **Food Chemistry**, v. 122, p. 589-595, 2010.

YEASMIN, T.; TANG, M.A.; RAZZAQUE, A.; ASBAR, N. Purification and characterization of three galactose specific lectins from mulberry seeds (*Morus* sp.) **European Journal of Biochemistry**. v. 268, p. 6005-6010, 2001.

YEH, G.Y.; EISENBERG, D.M.; KAPTCHUK, T.J.; PHILLIPS, R.S. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. **Diabetes Care** v. 26 p. 1277–1294, 2003.

ZALDIVAR, F., WANG-RODRIGUEZ, J., NEMET, D., SCHWINDT, C., GALASSETTI, P., MILLS, P.J., WILSON, L. D.; COOPER, D. M. Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. **Journal of Applied Physiology**. v. 100, p.1124-33. 2006.

ZHAO, Z.Y.; YIN, Z.X.; XU, X.P.; WENG, S.P.; RAO, X.Y.; DAI, Z.X.; LUO, Y.W.; YANG, G.; LI, Z.S.; GUAN, H.J.; LI, S.D.; CHAN, S.M.; YU, X.Q.; HE, J.G. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. **Journal of General Virology**, v.83, p. 347–56, 2009.

5 ARTIGO CIENTÍFICO 1

A ser submetido ao periódico “Toxicon”

Short Communication

Evaluation of oral toxicity on mice and artemicidal activity of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL)

Chrisjacele Santos Ferreira de Araújo^a, Tiago Ferreira da Silva Araújo^a, Cleideana Bezerra da Silva^a, Janaína Karin de Lima Campos Patrícia^a, Maria Guedes Paiva^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Vera Lúcia de Menezes Lima^a, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a

^a*Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.*

*Corresponding author. E-mail: lcbbcoelho@gmail.com

Abstract

This work aimed to determine the toxicity of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) to mice and *Artemia salina*. BmoLL did not induce death and weight loss of mice at 2000 mg/kg b.w. Also, it did not affect the survival of *A. salina* at the assayed concentrations (250–1,000 µg/mL). In conclusion, BmoLL is an interesting molecule to investigate pharmacological applications due to its low toxicity according the two models used in this work.

Keywords: *Bauhinia monandra*, leaf lectin, risk assessment, acute toxicity.

Lectins are carbohydrate-binding proteins that have been reported to exert toxic effects on bacteria, fungi, insects and mollusks (Gomes et al., 2013; Paiva et al., 2013; Albuquerque et al., 2014a,b). The toxicity of lectins to mammals is variable and risk assessments are essential since these proteins possess a broad range of applications in pharmacology field. For example, in vivo antitumor, antinociceptive, anti-helminthic, healing, and chemotactic activities of lectins have been also described (Andrade et al., 2004; Figueiredo et al. 2009, 2010; Melo et al., 2011; Coriolano et al., 2014).

Bauhinia monandra Kurz (Fabaceae), known as “Napoleon’s plume”, “pink Bauhinia” or “orchid tree”, among other denominations, is a evergreen shrub or tree popularly used with several medicinal purposes. It is native from Asia but is broadly distributed in Central and South America. The pods are commonly used to treat intestinal disorders and preparations obtained from the leaves are applied as anti-inflammatory and to reduce the glycemia in diabetic patients (Menezes et al., 2007; Ezuruike and Prieto, 2014).

The leaves of *B. monandra* contain a galactose-specific lectin (BmoLL, *B. monandra* leaf lectin), which was isolated with high yield by affinity chromatography on guar gel

column (Coelho and Silva, 2000). The structure of BmoLL contains a glycosylated subunit of 33 kDa and a non-glycosylated subunit of 26 kDa. This protein showed insecticidal activity (Macedo et al., 2007) and is able to recognize dengue serotypes selectively (Andrade et al., 2011). Genotoxicity assessment of BmoLL revealed that it did not show any harmful effect on DNA but instead displayed a protective antioxidant effect (Sisenando et al., 2009). The use of *B. monandra* leaves by maceration or infusion to treat diabetes stimulates the evaluation of BmoLL hypoglycemic activity. However, it is firstly necessary to determine the toxicity degree of this lectin. In this work, it was evaluated the toxicity of BmoLL by two models: acute oral toxicity on mice and *Artemia salina* (brine shrimp) lethality assay.

The leaves of *B. monandra* were collected at the campus of the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE), Recife, Brazil. A voucher specimen is archived under number 57,462 at the Herbarium *Dárdano de Andrade Lima* from the *Instituto Agrônomo de Pernambuco*, Recife. BmoLL was isolated according the protocol previously described by Coelho and Silva (2000), the leaves were triturated using a blender and 15 g of the resulting powder were suspended in 150 ml of 10 mM citrate-phosphate buffer pH 6.5, containing 0.15 M NaCl. The suspension was stirred for 16 h at 4 °C and then the material was filtered through gauze and centrifuged for 15 min at 12,000 *g* at 4 °C. The supernatant (crude extract) was treated with ammonium sulfate (60% saturation) for 4 h at 28 °C and then centrifuged (12,000 *g*, 4 °C, 15 min). The collected precipitate (0-60% fraction) was resuspended with distilled water, dialyzed against 10 mM citrate-phosphate buffer pH 6.5 (containing 0.15 M NaCl) and loaded onto a guar gel column previously equilibrated with the citrate-phosphate buffer. Extensive washing was performed until absorbance at 280 nm was zero; the adsorbed protein (BmoLL) was recovered from the column with 200 mM galactose prepared in citrate-phosphate buffer (Coelho and Silva, 2000). Following, BmoLL was dialyzed against for removal of the eluent. Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951).

Female Swiss mice weighing 30 ± 2 g (about 50 days old) were obtained from the bioherium of the *Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)* from the *Universidade Federal de Pernambuco* and transferred to an animal testing laboratory. The mice were kept at a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with light and dark cycles of 12/12 h (light from 6 to 18 h and dark from 18 to 6 h) and received food and water *ad libitum*. The assays performed in this work were approved by the Ethics Committee on Animal Research from the *Universidade Federal de Pernambuco* (process number 23076.055063/2009-61).

Acute toxicity of BmoLL was evaluated according to the instructions of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2001) using female mice. The animals were submitted to a food fasting period of 4 h with water *ad libitum*. Three animals received BmoLL (in 0.9% sterile NaCl) at 300 mg/kg b.w. by oral administration and were observed during 14 days (during the first 4 h after treatment and then once a day). A control group (n=3) received only the vehicle. The toxicity assay was also performed using the same protocol and a higher dose (2000 mg/kg b.w.) of BmoLL. At the ending of the experiments, the animals were euthanized using 50 mg/kg b.w. chlorpromazine (i.m.) followed by 150 mg/kg b.w. sodium pentobarbital (i.p.). Significant differences between groups were determined using Student's *t* test at significance level of $p < 0.05$.

Toxicity of BmoLL to *A. salina* was determined according to the method described by Meyer et al. (1982). Groups of 12–15 *A. salina* larvae were exposed to BmoLL (250–1,000 $\mu\text{g/mL}$) diluted in natural seawater to a final volume of 5 mL. After 24 h, the survival rates (%) were recorded. In the control group, larvae were incubated in seawater. Three independent experiments were performed in triplicate.

BmoLL did not induce death of mice using 300 mg/kg b.w. as starting dose; thus, we tested the dose of 2000 mg/kg b.w., according to the instructions of Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2001). Again, no death was detected,

which fits the lectin in Category 5 ($LD_{50} > 2000$ mg/kg b.w.) and indicates that it is of relatively low acute toxicity. No loss of weight was detected in daily analysis (Figure 1A) and the weight gain at the end of the test was similar in control and BmoLL treatments (Figure 1B). Among the additional observations indicated by OECD it was noted that the mice only demonstrated sleep.

The lectins comprise a diversified group of proteins in biological aspects due to their high variability in structural and physico-chemical features as well as in specificity of their carbohydrate-binding sites (Sharon and Lis, 2004). In this way, their biological effects as well as toxicity degree to mammals differ. For example, ricin is a heat stable protein able to poison several animals, with LD_{50} values for mice ranging from 5 μ g/kg b.w. (inhalation and intravenous injection), 20 mg/kg b.w. (intragastric administration) to 30 mg/kg b.w. (oral ingestion). The high toxicity of ricin has been attributed to the ubiquity of “receptors” for this lectin in the body of animals (Franz and Jaax, 1997; Garber, 2008). Conversely, the lectin from *Crataeva tapia* bark showed a low acute toxicity (LD_{50} higher than 2000 mg/kg b.w.) when orally administered to mice (Araújo et al., 2011), similarly to BmoLL. Some lectins have an intermediate degree of toxicity, such as that from *Phaseolus acutifolius* seeds, which affected small intestine, spleen and thymus of CD-1 mice but showed a LD_{50} of 1100 mg/kg b.w. (intraperitoneal injection) indicating a still low acute toxicity (Reynoso-Camacho et al., 2003).

Preparations from *B. monandra* leaves have been assayed for toxicity in different situations and low toxicity was also detected, similarly to BmoLL. A methanolic extract from leaves did not cause mortality of rats when orally administered (8 g/kg b.w.) and did not promote histopathological effects in liver, spleen, testes and kidneys at 2 and 4 g/kg b.w. (Alade et al., 2009). The effects of *B. monandra* leaf extracts on pregnant rats were also investigated. Aqueous and ethanol extracts (until 7,000 mg/kg/day) did not affect the survival

of rats and fetuses; preparations did not promote any malformation of viscera or skeleton. In addition, the aqueous extract showed a beneficial effect since it promoted increased implantation and decreased post implantation loss (Mendes et al., 2010).

BmoLL did not affect the survival of *A. salina* larvae at the tested concentrations. The lethality assay using this micro crustacean was as indicator of cytotoxicity against tumor cells as well as toxicity to aquatic environments (Albuquerque et al., 2014a). In this sense, this result indicates that BmoLL probably is a generally low toxic protein, including aquatic animals.

In summary, BmoLL is an interesting molecule to investigate pharmacological applications due to its low toxicity since it was previously proved no mutagenic (Sisenando et al., 2009) and now demonstrated low toxicity to mice, when orally administered, and low toxicity to *A. salina*.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants and fellowships (VLML and LCBBC). We are also grateful to the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE), and the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for financial support. C.S.F. Araújo would like to thank FACEPE for graduate scholarship. The authors also thank Maria Reis Barbosa da Silva, João Antônio Víriginio and Albérico Real do Espírito Santo Filho for technical assistance.

References

Alade, G.O., Akanmu, M.A., Obuotor, E.M., Osasan, S.A., Omobuwako, O.R., 2009. Acute and oral subacute toxicity of methanolic extract of *Bauhinia monandra* leaf in rats. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 3, 354-358.

- Albuquerque, L.P., Pontual, E.V., Santana, G.M.S., Silva, L.R.S., Aguiar, J.S., Coelho, L.C.B.B., Rêgo, M.J.B.M., Pita, M.G.R., Silva, T.G., Melo, A.M.M.A., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., 2014a. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. *Acta Trop.* 138, 23-27.
- Albuquerque, L.P., Santana, G.M.S., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B., Silva, M.V., Paiva, P.M.G., 2014b. Antifungal activity of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on genetically distinct *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 1098-1105.
- Andrade, C.A.S., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Nascimento, S.C., Santos-Magalhães, N.S., 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Int. J. Pharm.* 278, 435–445.
- Andrade, C.A.S., Oliveira, M.D.L., Melo, C.P., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., Nogueira, M L., Singh, P.R., Zeng, X., 2011. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic–inorganic nanocomposite and *Bauhinia monandra* lectin. *J. Coll. Interf. Sci.* 362, 517–523.
- Araújo, R.M.S., Vaz, A.F.M., Aguiar, J.S., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., Melo, A.M.M., Silva, T.G., Correia, M.T.S., 2011. Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, antiinflammatory and analgesic activities. *Nat. Prod. Bioprospect.* 1, 97–100.
- Coelho, L.C.B.B., Silva, M.B.R., 2000. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochem. Anal.* 11, 295-300.
- Coriolano, M.C., Melo, C.M.L., Silva, F.O., Schirato, G.V., Porto, C.S., Santos, P.J.P., Correia, M.T.S., Porto, A.L.F., Carneiro-Leão, A.M.A., Coelho, L.C.B.B., 2014. *Parkia*

- pendula* seed lectin: Potential use to treat cutaneous wounds in healthy and immunocompromised mice. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 2682-2693.
- Ezuruike, U.F., Prieto, J.M., 2014. The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations. *J. Ethnopharmacol.* 155, 857-924.
- Figueiredo, J.G., Bitencourt, F.S., Cunha, T.M., Luz, P.B., Nascimento, K.S., Mota, M.R.L., Sampaio, A.H., Cavada, B.S., Cunha, F.Q., Alencar, N.M.N., 2010. Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces inflammatory hypernociception: Involvement of nitric oxide. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 96, 371-377.
- Figueiredo, J.G., Bitencourt, F.S., Mota, M.R.L., Silvestre, P.P., Aguiar, C.N., Benevides, R.G., Nascimento, K.S., Moura, T.R., Dal-Secco, D., Assreuy, A.M.S., Cunha, F.Q., Vale, M.R., Cavada, B.S., Alencar, N.M.N., 2009. Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D. rostrata* lectin: Involvement of cytokines and nitric oxide. *Toxicon* 54, 736-744.
- Franz, D.R., Jaax, N.K., 1997. Ricin toxin, in: Sidell, F.R., Takafuji, E.T., Franz, D.R. (Eds.), *Medical aspects of chemical and biological warfare*. Office of The Surgeon General at TMM Publications, Washington D.C., pp. 631-642.
- Garber, E.A.E., 2008. Toxicity and detection of ricin and abrin in beverages. *J. Food Prot.* 71, 1875-1883.
- Gomes, F.S., Procópio, T.F., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2013. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *J. Appl. Microbiol.* 114, 672-679.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Silva, M.B.R., Coelho, L.C.B.B., 2007. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera:

- Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Comp. Biochem. Physiol. A 146, 486-498.
- Melo, C.M.L., Lima, A.L.R., Beltrão, E.I.C., Cavalcanti, C.C.B., Melo-Júnior, M.R., Montenegro, S.M.L., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., Carneiro-Leão, A.M.A., 2011. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine Schistosomiasis mansoni. Acta Trop. 118, 152-158.
- Mendes, C.C., Marinho, C.M., Moreira-Junior, V.F., Queiroz, F.M., Dantas, G.L., Macedo, M.F., Oliveira, C.N., Schwarz, A., 2010. Evaluation of *Bauhinia monandra* aqueous and ethanol extracts in pregnant rats. Pharm. Biol. 48, 780-785.
- Menezes, F.S., Minto, A.B.M., Ruela, H.S., Kuster, R.M., Sheridan, H., Frankish, N., 2007. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. Rev. Bras. Farmacogn. 17, 8-13.
- Meyer, B. N., Ferrigini, N. R., Putman, J. E., Jacobson, L. B., Nichols, D. E., McLaughlin, J. L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med. 45, 31-34.
- OECD, 2001. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Paiva, P.M.G., Pontual, E.V., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B., 2013. Lectins and trypsin inhibitors – Biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae, first ed. Nova Science Publishers Inc., New York.
- Reynoso-Camacho, R., Mejía, E.G., Loarca-Piña, G., 2003. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). Food Chem. Toxicol. 41, 21-27.

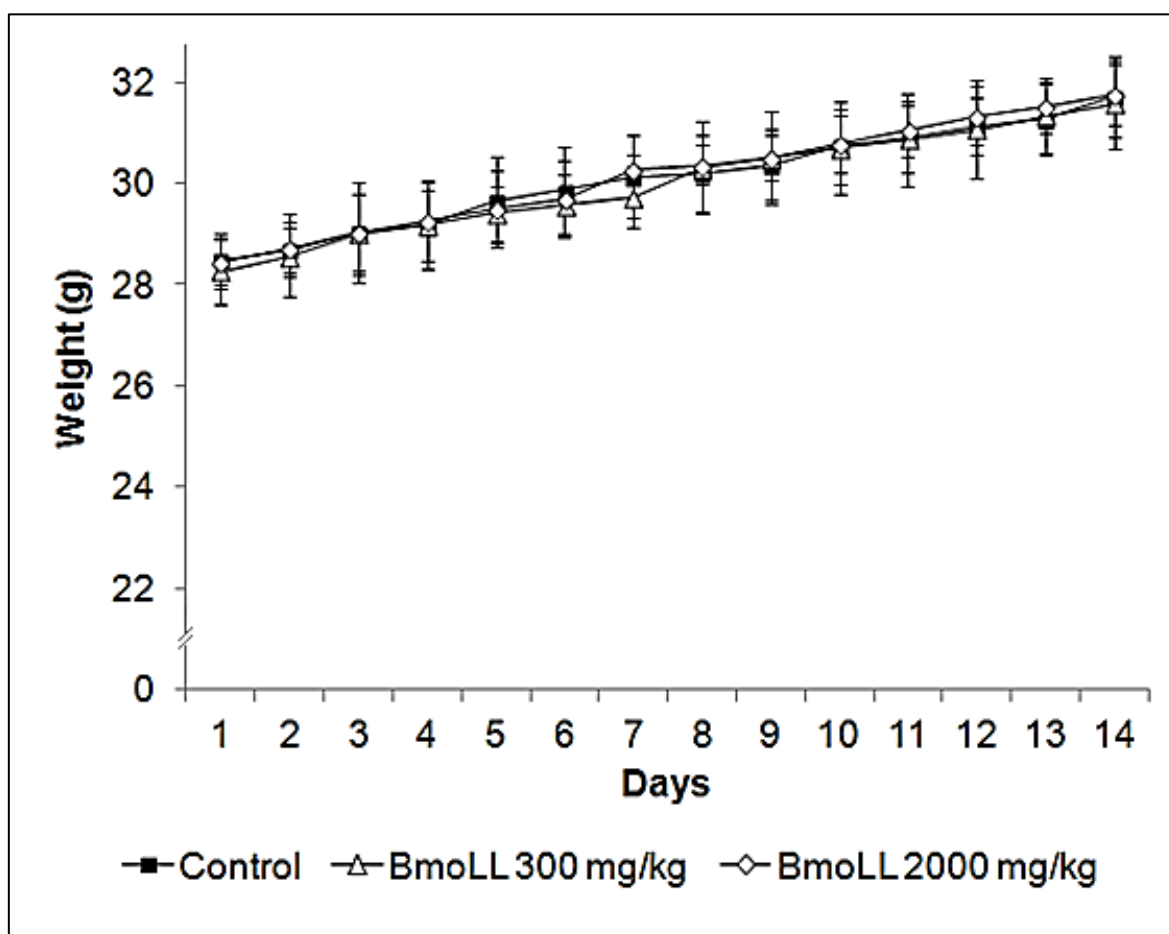
Sharon, N., Lis, H., 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14, 53R–62R.

Sisenando, H.A A.A.C.N., Macedo, M.F.S., Saturnino, A.C.R.D., Coelho, L.C.B.B., Medeiros, S.R B., 2009. Evaluation of the genotoxic potential of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). *Food Chem. Toxicol.* 47, 303-308.

Figure caption

Figure 1. Assessment of the effects of oral ingestion of BmoLL on weight of mice. Weight of mice at each day of test in control and BmoLL treatments. Identical letters indicate no significant differences ($p>0.05$).

Figure 1



6. ARTIGO CIENTÍFICO 2

A ser submetido ao periódico “Applied Biochemistry and Biotechnology”

Hypoglycemic activity evaluation of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) in NOD (non obese diabetic) mice

Chrisjacele Santos Ferreira de Araújo^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Carina Malaguti^b,
Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Vera Lúcia de Menezes Lima^a, Luana Cassandra Breitenbach
Barroso Coelho^a, Anibal Eugenio Vercesi^{b,*}

^a*Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.*

*Corresponding author. E-mail: anibal@unicamp.br

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic disorders resulting from defects in secretion and/or action of insulin leading to hyperglycemia. Studies with various plants having folk medicine reputation for its hypoglycemic potential have shown promising results in experimental models of diabetes, such as leaf extracts from *Bauhinia monandra*. Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin which recognize and bind carbohydrates in a specific and reversible approach. This study investigated whether the *B. monandra* leaf lectin (BmoLL) have hypoglycemic activity using non obese diabetic (NOD) mice as experimental model. The NOD mice were treated by intraperitoneal administration of BmoLL (60 mg/kg/day), for 21 days. The lectin effect was compared with the data obtained for a non-treated diabetic group and non-diabetic (normoglycemic) mice. At the end of treatment with BmoLL the animals exhibited a significant ($p=0.002$) reduction (from 307.5 ± 83.3 mg/dL to 137.5 ± 68.3 mg/dL) in blood glucose, reaching value similar to normoglycemic group (110.5 ± 16.7 mg/dL). The non-treated diabetic group showed glucose concentration ≥ 500 mg/dL. Furthermore, the blood concentrations of triglycerides and VLDL-cholesterol were also significantly reduced by the treatment with BmoLL, as compared with the non-treated diabetic animals. Therefore, this work suggests that BmoLL was able to control blood glucose levels to normal values and minimized secondary complications of hyperglycemia. The results may have a clinical significance for the treatment of diabetes mellitus and may explain the basis for using *B. monandra* leaf extract in folk medicine.

Keywords: *Bauhinia monandra*, leaf lectin, NOD mice, diabetes mellitus, hypoglycemic action.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases resulting from deficiencies in the secretion and/or action of insulin leading to hyperglycemia; it can be classified in types 1 (DM1) and 2 (DM2) according to the etiology [1]. The DM1 is characterized by the destruction of the insulin-producing cells (beta cells) of pancreas due to an autoimmune dysfunction or another cause. It occurs frequently in children and adolescents but also occurs in people older than 20 years [2,3].

DM represents a high financial cost to society and health systems as well as shows a high mortality rate. Currently, it affects about 347 million people worldwide and it is estimated that it will be the 7th leading cause of death in 2030 [4]. Data from 2007 inform that, in Brazil, the average occurrence of diabetes in the adult population (over 18 years) is 5.2%, representing 6,399,187 people among which 5 to 10% are affected by DM1 [5].

Studies on new therapies for diabetes, in this sense, have been performed using distinct experimental models. Many of these studies have focused on the search for compounds that can assist in lowering blood glucose levels and the popular knowledge has provided basis for investigating plants that are applied to prepare herbal medicines used by patients with DM1 and DM2 to control glycemia [6]. The species of the genus *Bauhinia* (Fabaceae family), known as "paw-of-cow" or "cow's claw", are used for obtaining teas, infusions and other preparations for treatment of diabetes and infections, for example [7]. The hypoglycemic effect in rats of aqueous extracts from leaves of *Bauhinia monandra* [8], *B. megalandra* [9], *B. variegata* [10] and *B. forficata* [11,12] have been confirmed.

Previous studies in rats with diabetes induced by alloxan showed that aqueous extract from *B. thoningii* leaves reduced the glycemia and also promoted a reduction in risk of coronary heart disease caused by complications of diabetes [13]. Human patients who were using any medication for DM2 showed a significant improvement in decrease of blood

glucose levels when also used an infusion from *B. forficata* leaves [14].

Lectins are proteins that are able to bind carbohydrates specifically and reversibly [15]. The lectin purified from leaves of *B. monandra* (BmoLL, *B. monandra* leaf lectin) is galactose-specific and can be isolated by affinity chromatography on guar gel column [16]. BmoLL is constituted by a glycosylated subunit of 33 kDa and a non-glycosylated subunit of 26 kDa; it is possible to obtain more than 2 mg of BmoLL from 5 g of the powder from dried leaves [16]. The biotechnological applicability of BmoLL is large: it possesses ability to interact with lipid monolayers [17], showed insecticidal activity against larvae of *Zabrotes subfasciatus* and *Anagasta kuehniella* [18], and is able to selectively recognize dengue serotypes [19]. BmoLL did not show genotoxicity and cytotoxicity in a series of cell-free and bacterial assays displaying a protective antioxidant effect [20].

There are several models to be used on diabetes mellitus researches. A mice strain called NOD (non-obese diabetic) is considered an excellent model for DM1 similar to that found in humans. The NOD strain develops autoimmune diabetes also related to destruction of insulin-producing cells and was originally obtained in Japan, by inbreeding, from a cataract-prone strain (ICR) [21,22]. The incidence of spontaneous diabetes varies among 50 and 90% in females or among 0 and 20% in males, depending on intrinsic factors of the colony [21]. The mice of this strain that develop DM usually show an impairment of 95% beta-cells [23].

The hypoglycemic action of extracts from leaves of *Bauhinia* species, including *B. monandra*, stimulates the identification of the active principles. In this study we investigated the effect of BmoLL on reducing blood glucose levels of NOD female mice when injected intraperitoneally. Furthermore, the effects of BmoLL on blood levels of triglycerides, total cholesterol and VLDL-cholesterol were also evaluated.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material

B. monandra leaves were collected at the campus of the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE), Recife, Brazil. A voucher specimen is archived under number 57,462 at the Herbarium *Dárdano de Andrade Lima* from the *Instituto Agrônomo de Pernambuco*, Recife. The leaves were washed with tap water and dried at 28 °C for 2-3 days; following, tissues were powdered using a blender.

2.2. Animals

NOD mice are maintained in the *Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área do Laboratório de Ciência Animal* (CEMIB) at the *Universidade Estadual de Campinas* (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil. The colony was originated from matrices maintained at the Laboratory INSERM U-25 Neker, Paris, France. The animals were kept at a temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ with light and dark cycles of 12/12 h (light from 6 to 18 h and dark from 18 to 6 h). The mice received food and water ad libitum in the animal vivarium under sanitary conditions and free of known pathogens (SPF). The mice are fasted for 12 h and after this period they have free access to food. Animals were anesthetized intraperitoneally with sodium thiopental (Thiopentax, Cristália Chemicals Pharmaceuticals Ltd., Brazil) at the end of treatments and sacrificed (Itoh et al., 1997). This work was approved by the Ethics Committee on Animal Research (process number 23076.055063/2009-61; UFPE).

2.3. Purification of BmoLL

BmoLL was purified by a previously defined protocol [16]. *B. monandra* leaf powder

(15 g) was added to 150 ml of 10 mM citrate-phosphate buffer pH 6.5, containing 0.15 M NaCl. The mixture was kept overnight at 4 °C under gentle shaking using a magnetic stirrer. Next, the material was passed through gauze and centrifuged for 15 min at 12,000 *g* at 4 °C. Ammonium sulfate at 60% saturation was added to the supernatant in order to precipitate proteins; the material was kept under gentle agitation at 28 °C for 4 h and then centrifuged (12,000 *g*, 4 °C, 15 min). The precipitate (0-60% fraction) was resuspended with distilled water in a final volume of 20 ml and dialyzed against 10 mM citrate-phosphate buffer pH 6.5, containing 0.15 M NaCl. The 0-60% fraction was loaded onto a guar gel column previously equilibrated with the citrate-phosphate buffer. Extensive washing was performed until absorbance at 280 nm was zero; the adsorbed protein (BmoLL) was recovered from the column with 200 mM galactose prepared in citrate-phosphate buffer. BmoLL was evaluated for hemagglutinating activity, after dialysis against distilled water, according to Correia and Coelho [24] and protein concentration according to Lowry et al. [25]. Purified BmoLL was stored at -20 °C.

2.4. Treatment of diabetic mice with BmoLL

The fasting blood glucose of female mice, after 10 weeks of age, was checked weekly using a glycophyte (Optium Xceed, Abbott Diabetes Care, USA), withdrawing blood sample from the animal tail vein. Mice that showed glucose levels greater or equal to 250 mg/dL were considered diabetic [26] and used in assays. The maximum threshold detection of the glycophyte used is 499 mg/dL. Thus, blood glucose levels higher than this value were considered as ≥ 500 mg/dL.

The effect of intraperitoneal treatment with BmoLL was evaluated in groups of diabetic mice treated with the lectin during 21 days. Each group (n=4) was formed by female NOD mice that had developed diabetes; one group was intraperitoneally treated with BmoLL

at 60 mg/kg/day (BmoLL-treated diabetic group) and another was treated with distilled water (Non-treated diabetic group). A third group of non-diabetic animals (mice that did not develop diabetes from the 10th week of life) was monitored to evaluate normoglycemia levels (Non-diabetic group). Each treatment was performed in triplicate.

2.5. Biochemical analysis

The blood glucose levels from diabetic mice treated or not with BmoLL as well as from non-diabetic group was determined weekly during the 21 days of treatment. All glucose measurements were performed after a fast period of 12 h.

Blood samples were withdrawn, at the 21st day of treatment, for evaluation of lipid profile by determining total cholesterol, VLDL-cholesterol, triglycerides and HDL-cholesterol levels. All these parameters were measured by kits of enzymatic methods (Labtest Diagnostica, Brazil).

2.6. Body and liver weight evaluation

To analyze the gain or loss of weight of mice during the period of 21 days it was determined the weight of animals at the starting time of treatment and weekly until the end (21st day). The starting time for each group corresponded to the time when diabetes was detected and thus treatment was started (initial weight and relative value of 100%). The weight of livers was determined at the 21st day after sacrifice. The behavior of mice every day along experiment duration was also observed.

2.7. Statistical analysis

Results were expressed as mean $\pm$ standard deviation; the significance of differences between the groups was assessed using the Student's *t*-test (significance at $p < 0.05$).

3. Results

Figure 1 shows the results from the weekly monitoring of the blood glucose levels from diabetic NOD mice treated or not with BmoLL. Time zero did not show significant difference ($p>0.05$) among hyperglycemic peaks of the group which would be submitted to treatment with BmoLL and the group that would receive only distilled water. The non-diabetic group showed normoglycemic level of 104.25 ± 22.43 mg/dL. BmoLL-treated diabetic group showed a decrease in blood glucose levels from the first week of treatment. The mean blood glucose level was 186.5 ± 109.3 mg/dL at the 7th day, with a high standard deviation value. The blood glucose levels did not alter significantly ($p>0.05$) in the subsequent two weeks, however, there was a considerable decrease in the standard deviation which can be linked to a better stabilizing effect of the lectin on glucose levels. The non-treated diabetic group, in the same period, showed a significant ($p<0.05$) increase in blood glucose concentration, reaching 443.5 ± 28.6 mg/dL at the 7th day and levels higher than 500 mg/dL at 14th and 21st days. The non-diabetic group showed similar normoglycemic levels during all the experiment. BmoLL-treated group at the last week (21st day) showed glucose levels below that used to consider mice as diabetics (i.e. lower than 250 mg/dL) and close to the levels from non-diabetic (normoglycemic) group.

Diabetic mice treated with BmoLL, in comparison with the non-treated diabetic group, showed significantly lower ($p<0.05$) triglyceride and VLDL-cholesterol levels while there was no significant difference regarding total cholesterol and HDL-cholesterol levels (Table 1). The HDL-cholesterol level in mice treated with BmoLL, in comparison with the non-diabetic group, was lower while VLDL-cholesterol and triglycerides were higher (Table 1).

Figure 2 shows the results from the comparison among the initial weight of mice and their weight at the end of treatment. Non-diabetic group showed a discrete weight gain along

the 21 days of experiment but this increase was not statistically significant ($p>0.05$). The group treated with BmoLL presented a slight weight loss within the first 7 days of treatment (relative value of $96.9 \pm 1.2\%$), the same period in which the blood glucose levels were not stable (Figure 1). The mice at the 14th and 21st day did not show significant reduced weight in regard to initial weight (relative values of $98.9\% \pm 1.1$ and $99.8 \pm 1.3\%$, respectively). Weight loss was detected in non-treated diabetic group throughout the experiment (relative value of $87.1 \pm 2.0\%$ at the 21st day).

The ratio between liver weight and total weight of mice at the 21st day was determined. The data (Figure 3) showed that ratios determined for BmoLL-treated diabetic group and non-diabetic group were similar, with no statistically significant difference. On the other hand, non-treated diabetic group showed an average ratio very higher ($p<0.05$) than those of the other groups.

Observations regarding the behavior of mice during the 21 days of treatment indicated that control group showed a much greater volume of urine (although it was not determined the precise volume of urine) and a difficulty in vision, suggesting the occurrence of polyuria and loss of vision as consequence of diabetes. These aspects were not observed in the other groups.

4. Discussion

The purification of BmoLL in milligram amounts using the procedure established by Coelho and Silva [16] allowed the investigation of its *in vivo* hypoglycemic activity. Our study aimed to yield a scientific basis for the popular use of *B. monandra* leaf extracts in order to reduce glycemia in diabetic people. Hypoglycemic effect in rats induced by aqueous

extracts from leaves of *B. monandra* has been reported [8] but this activity was not attributed to any specific component.

The NOD mice that developed autoimmune diabetes by destruction of insulin-producing cells were used to evaluate BmoLL effect as well as a control group (non-treated diabetic). Some mice, as expected, did not reveal diabetes (normoglycemic) and then they were separated into a non-diabetic group; at the end of experiment, it was also observed whether these mice, in addition to be normoglycemic, did not show classic effects of diabetes. The characteristics determined in BmoLL-treated group were compared with those from both non-treated diabetic and non-diabetic groups.

The control group exhibited hyperglycemia that increased along the time. The results showed that BmoLL was effective in decreasing the serum glucose levels of diabetic NOD mice. Interestingly mice treated with BmoLL showed levels of glucose near to those found in the group that did not develop diabetes. These data suggest that BmoLL was able to compensate the lack of insulin production at least in regard to avoid high glucose concentrations in plasma.

Ojezele and Abatan [13] detected hypoglycemic activity of a *B. thoningii* leaf extract and hypothesized that the mechanism may involve inhibition of glucose absorption at digestive tract level as well as glycolysis stimulation and inhibition of gluconeogenesis. BmoLL, as a carbohydrate-binding protein, can interact with glycosylated molecules and receptors that are involved with absorption and metabolic use of glucose and thus may act in a similar form to that referred by these authors.

It is known that patients with uncompensated DM1 usually develop several complications resulting from deregulation of glucose and lipid metabolisms. There is a high mobilization of fatty acids from adipose tissue, in the absence of insulin, leading to an increased concentration of fatty acids circulating in the blood. The exacerbated lipid

mobilization results in increased production of ketone bodies, causing diabetic ketoacidosis and weight loss [27,28]. There is a stimulation of gluconeogenesis in the liver due to the high levels of glucagon hormone [29], whose secretion is increased due to the absence of counter-regulatory mechanisms exerted by insulin. Additionally, the liver receives excess of fatty acids from the blood and then increases production of VLDL particles and triglycerides. However, the VLDL released by the liver accumulates in the blood vessels because the endothelial lipases are down-expressed (due to the absence of insulin) and the elevated blood levels of fatty acids derived from adipose tissue decrease the lipolysis of VLDL triglycerides. All these effects are accompanied by reduced levels of HDL. In this sense we analyzed the lipid profile and body weight of mice after the 21 days of experiment.

Animal models with induced diabetes also develop dyslipidemia, which is usually reversed by treatments that promote reduction of blood glucose [30,31]. The hypoglycemic action of BmoLL was accompanied by triglycerides and VLDL-cholesterol levels lower than those in non-treated diabetic group, which suggest that the lectin also interfere in the lipid mobilization. The HDL-cholesterol level, however, remained similar to that of control and lower than in normoglycemic group.

Bauhinia extracts have been evaluated for effects on plasma lipid profiles from animals, both diabetic or not. Ethanolic and aqueous extracts from the stem bark and root of *B. variegata* promoted reduction in VLDL and trygliceride levels of Albino male Wistar rats [10]. The authors suggested that flavanoids would be involved in this property and these extracts were also able to promote an increase in HDL levels. Alloxan-diabetic rats treated with aqueous, ethanolic and hexanic extracts of *B. forficata* leaves showed reductions in blood glucose, triglycerides, and total cholesterol in comparison with non-treated diabetic rats; however these extracts did not alter LDL levels and also decreased HDL levels [11]. Pure

BmoLL showed more interesting results since this lectin, although did not interfere in HDL levels, was able to reduce the blood concentration of LDL-cholesterol.

The non-diabetic group showed no significant variations in body weight while the non-treated diabetic mice continually lose weight at the same time as they presented increasing hyperglycemic levels. BmoLL-treated group loses weight in just the first seven days when it still showed hyperglycemia but from the 15th day the mice recovered the lost weight showing final values near to the initial weight. These results allow considering a clear relationship between reduction of glucose levels by BmoLL and weight regain.

When the process of insulin compensation of DM1 patients is beginning, the excessive administration of insulin may lead to development of hepatomegaly, which can be reversed by adjustment of insulin dose. This occurs because the hyperinsulinization leads to glycogenosis by excessive accumulation of glycogen [32,33]. To evaluate if the administered BmoLL dose (60 mg/kg/day) could be excessive, we investigated if mice treated with the lectin developed hepatomegaly. The data obtained (Figure 3) showed that the ratio liver/body weight was similar in BmoLL-treated and non-diabetic groups revealing that the lectin dose did not result in hepatomegaly as a side effect. On the other hand, diabetic mice showed an increased ratio between liver and body weights probably as a result of metabolic imbalance caused by diabetes.

The difficulty in vision and polyuria observed in control group (untreated diabetes) are reported as consequences of diabetes. The poorly controlled DM results in microangiopathies such as retinopathy which is known as the most frequent cause of blindness [34,35]. We observed that BmoLL-treated diabetic group and normoglycemic mice did not show difficulty in vision suggesting that the lectin effect also prevented this complication of diabetes.

The increase in urine volume in diabetes has been linked to intense thirst (polydipsia) due to disturbances in water balance and electrolytes as well as increased filtration of glucose

by the kidney, which exceeds the capacity of reabsorption by the proximal tubule. The polyuria can cause hypotension and the lack of insulin also causes efflux of K^+ resulting in hypocalcaemia.

5. Conclusion

BmoLL was able to reduce the blood glucose levels of diabetic NOD mice for normoglycemic levels. The hypoglycemic effect of BmoLL was accompanied by reversion in the trend of weight loss by mice observed to non-treated diabetic group. BmoLL treatment also minimized complications of diabetes such as dyslipidemia (although HDL levels remained low) as well as prevented the occurrence of polyuria and loss of vision.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants and fellowships (PMGP, VLML, LCBBC and AEV). We are also grateful to the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE), and the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for financial support. C.S.F. Araújo would like to thank FACEPE for graduate scholarship. The authors also thank Maria Reis Barbosa da Silva, João Antônio Víriginio, Albérico Real do Espírito Santo Filho and Edilene Santos for technical assistance.

References

1. Buowari, O. Y. (2013), in *Diabetes Mellitus - Insights and Perspectives*, (Oguntibeju, O.O., ed.). In Tech, Rijeka, pp. 131-148.

2. Nabors, L., Ritchey, P. N., Van Wassenhove, B. & Bartz, J. (2011), in Type 1 Diabetes – Complications, Pathogenesis and Alternative Treatments, (Liu, C.-P., ed.). In Tech, Rijeka, pp. 85-94.
3. Centers for Disease Control and Prevention (2011), National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta.
4. World Health Organization (2013), Diabetes. Fact sheet 312.
5. Dados estatísticos – diabetes 2007. Available from: <http://portal.saude.gov.br>. Accessed August 29, 2013.
6. Yeh, G. Y., Eisenberg, D. M., Kaptchuk, T. J. & Philips, R. S. (2003). *Diabetes Care*, 253, 3862-3869.
7. Silva, K. L. & Cechinel-Filho, V. (2002). *Química Nova*, 25, 449-454.
8. Menezes, F. S., Minto, A. B. M., Ruela, H. S., Kuster, R. M., Sheridan, H. & Frankish, N. (2007). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 8-13.
9. Gonzalez-Mujica, F., Motta, N., Márquez, A.H. & Capote-Zulueta, J. (2003). *Fitoterapia*, 74, 84-90.
10. Rajani, G. P. & Ashok, P. (2009). *Indian Journal of Pharmacology*, 41, 227-232.
11. Lino, C. D., Diogenes, J. P. L., Pereira, B. A., Faria, R. A. P. G., Neto, M. A., Alves, R. S., de Queiroz, M. G. R., de Sousa, F. C. F. & Viana, G. S. B. (2004). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27, 125-127.
12. Cunha, A. M., Menon, S., Menon, R., Couto, A. G., Bürger, C. & Biavatti, M. W. (2010). *Phytomedicine*, 17, 37-41.
13. Ojezele, M. O. & Abatan, O. M. (2011). *African Health Sciences*, 11, 85–89.

14. Moraes, E. A., Rempel, C., Périco, E. & Strohschoen, A. A. G. (2010). *ConScientiae Saúde*, 9, 569-574.
15. Paiva, P. M. G., Pontual, E. V., Napoleão, T. H. & Coelho, L. C. B. B. (2013) Lectins and trypsin inhibitors – Biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae, 1st ed., Nova Science Publishers Inc., New York, NY.
16. Coelho, L. C. B. B. & Silva, M. B. R. (2000). *Phytochemical Analysis*, 11, 295-300.
17. Rosilio, V., Boissonnade, M., Coelho, L. C. B. B., Santos-Magalhães, N. S., Andrade, C. A. S. & Baszkin, A. (2004). *Colloids and Surfaces A*, 250, 491-497.
18. Macedo, M. L. R., Freire, M. G. M., Silva, M. B. R. & Coelho, L. C. B. B. (2007). *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 146, 486-498.
19. Andrade, C. A. S., Oliveira, M. D. L., Melo, C. P., Coelho, L. C. B. B., Correia, M. T. S., Nogueira, M. L., Singh, P. R. & Zeng, X. (2011). *Journal of Colloid and Interface Science*, 362, 517–523.
20. Sisenando, H. A. A. A. C. N., Macedo, M. F. S., Saturnino, A. C. R. D., Coelho, L. C. B. B. & Medeiros, S. R. B. (2009) *Food and Chemical Toxicology*, 47, 303-308.
21. Kikutani, H., Makino, S. (1992). *Advances in Immunology*, 51, 285-322.
22. Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K. & Tochino, Y. (1980). *Jikken Dobutsu*, 29, 1-13.
23. Hernandorena, B. H., Gonzales, J. C. R. & Garcia, J. C. R. (2001). *Revista Cubana de Endocrinologia*, 12, 168-177.
24. Correia, M. T. S. & Coelho, L. C. B. B. (1995). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 55, 261-73.
25. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

26. Karabas, M. K., Ayhan, M., Guney, E., Serter, M., Meteoglu, I. (2013). *ISRN Endocrinology*, 2013, article 858690.
27. Daneman, D. (2006). *The Lancet*, 367, 11-17.
28. Fredheim, S., Johannesen, J., Johansen A., Lyngsøe, L., Rida, H., Andersen, M. L. M., et al. (2013). *Diabetologia*, 56, 995–1003.
29. He, S., Wang, D., Lu, Y., Chen, Y., Jin, X., Wang, C., et al. (2013). *Experimental Biology and Medicine*, 238, 385-391.
30. Chung, I.-M., Kim, E.-H., Yeo, M.-A., Kim, S.-J., Seo, M.-C. & Moon, H.-I. (2011). *Food Research International*, 44, 127-132.
31. Meenakshi, P., Bhuvaneshwari, R., Rathi, M. A., Thirumoorthi, L., Guravaiah, D. C. & Jiji, M. J. (2010). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 1153-1159.
32. Abaci, A., Bekem, O., Unuvar, T., Ozer, E., Bober, E., Arslan, N., et al. (2008). *Journal of Diabetes and its Complications*, 22, 352-328.
33. Bua, J., Marchetti, F., Faleschini, E., Ventura, A. (2010). *The Journal of Pediatrics*, 157, 1042.
34. Khan, T., Bertram, M. Y., Jina, R., Mash, B., Levitt, N., Hofman, K. (2013). *Diabetes Research and Clinical Practice*, 101, 170-176.
35. Klein, R., Lee, K. E. L., Gangnon, R. E. & Klein, B. E. K. (2010). *Ophthalmology*, 117, 63-70.

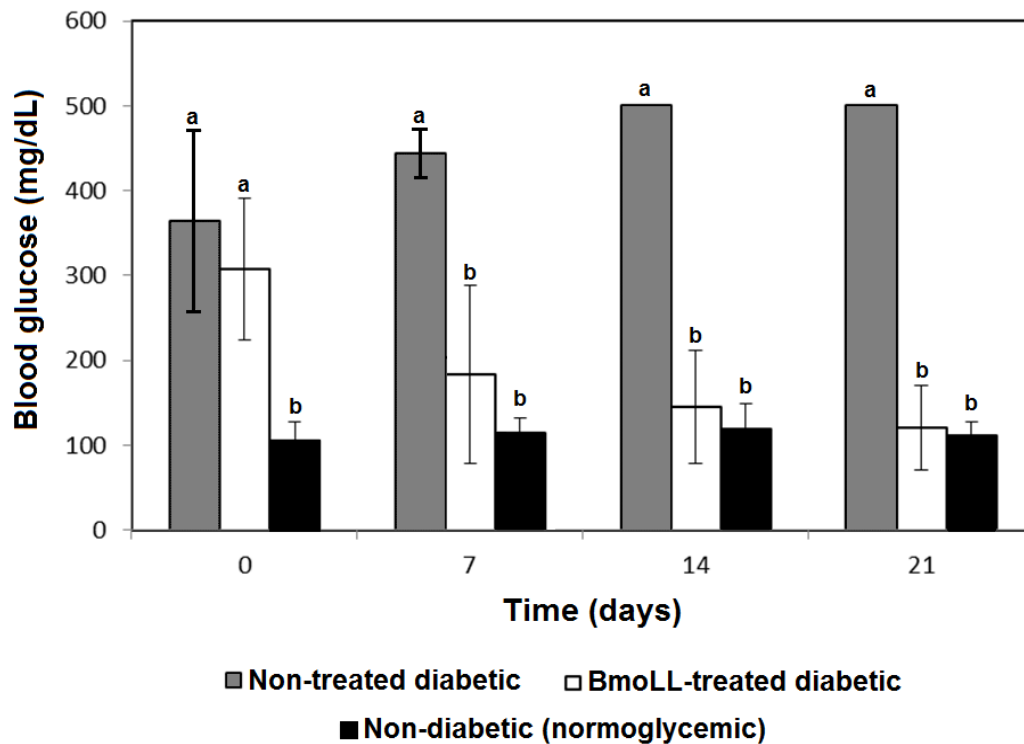


Fig. 1. Blood glucose levels from diabetic NOD mice treated or not with pure BmoLL at time 0 (zero), before treatment, as well as after 7, 14, and 21 days of treatment (three groups, n = 4). A non-diabetic (normoglycemic) group was also accompanied during the same period. The BmoLL-treated diabetic group received a dose of 60 mg/kg/day; the non-treated diabetic group received vehicle (water). After 7 days, BmoLL-treated group showed a statistically significant difference ($p < 0.05$) as compared with non-treated diabetic group. The BmoLL-treated group compared with non-diabetic (normoglycemic) group did not show statistically significant difference ($p > 0.05$).

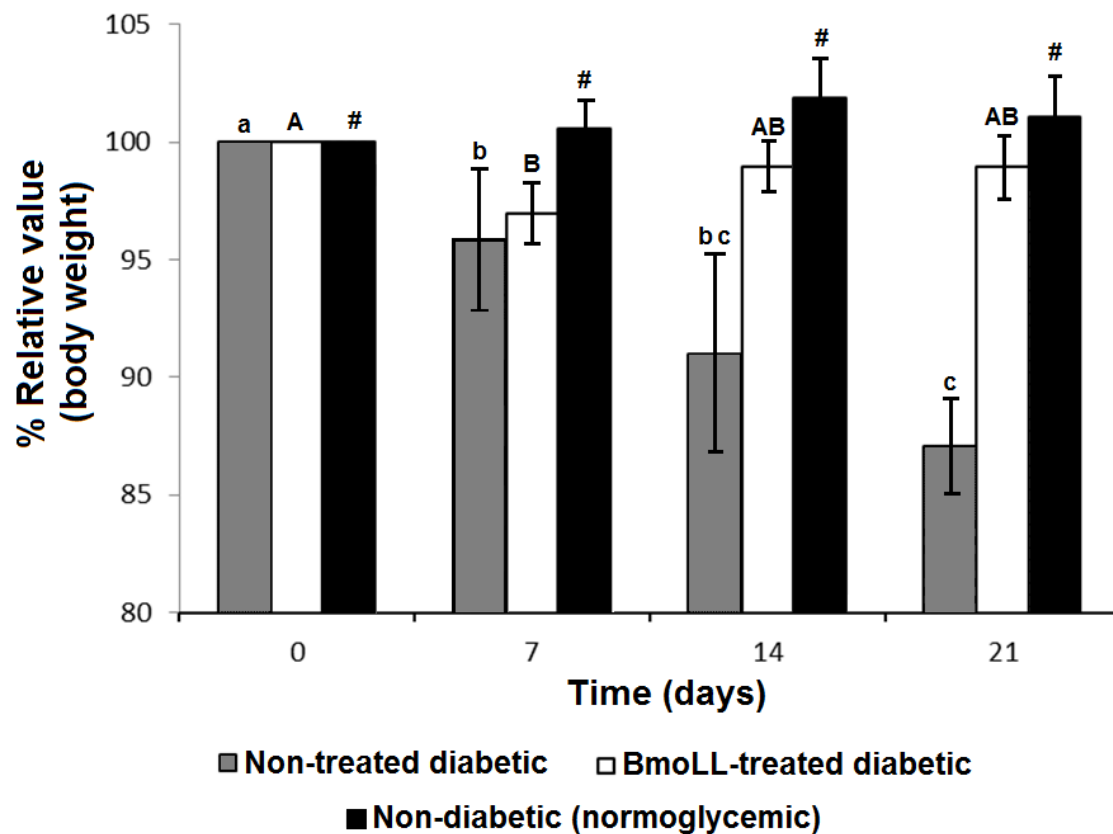


Fig. 2. NOD mice weighing during the assay period, divided into time 0 (zero), start of treatment, as well as after 7, 14 and 21 days of treatment. The groups were: non-treated diabetic group (water); BmoLL-treated diabetic group (60mg/kg/day), non-diabetic (normoglycemic) group. Different lowercase letters indicate significant ($p < 0.05$) differences between the values determined for non-treated diabetic group at different times. Different uppercase letters indicate significant ($p < 0.05$) differences between the values determined for BmoLL-treated diabetic group at different times. Different symbols indicate significant ($p < 0.05$) differences between the values determined for non-diabetic group at different times.

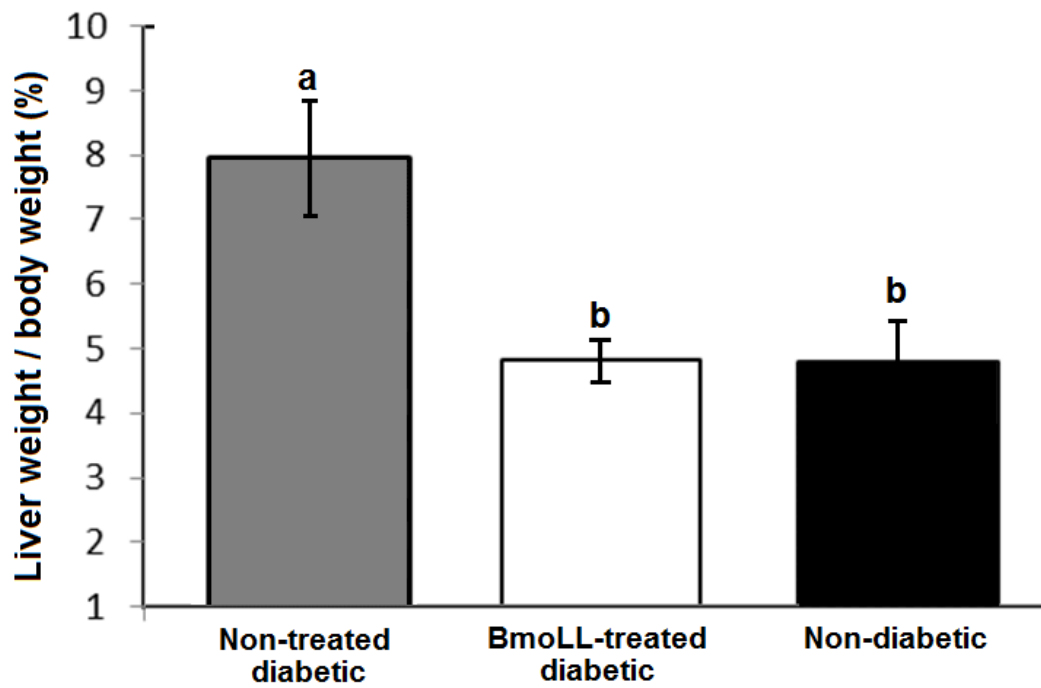


Fig. 3. Average per group of the ratio (%) between liver weights and body weights from NOD mice, divided into the following groups: non-treated diabetic group (water); BmoLL-treated diabetic group (60mg/kg/day), non-diabetic (normoglycemic) group. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

Table 1: Lipid profile in NOD mice from BmoLL-treated diabetic, non-treated diabetic, and non-diabetic (normoglycemic) groups. The values were determined at the end of experiment (21st day after treatment beginning).

Plasma lipid (mg/dL)	Groups			Reduction promoted (%)
	Non-treated diabetic	Non-diabetic (normoglycemic)	BmoLL- treated diabetic	
Triglycerides	348.7±128.7 a	73.6±14.9 b	115.5±48.1 b	66.9
Total cholesterol	89.0±12.7 a	74.7±14.9 a	65.7±48.1 a	26.1
VLDL-cholesterol	69.7±25.7 a	14.7±3.0 b	23.1±9.6 b	66.9
HDL-cholesterol	30.7±3.7 a	42.4±4.8 b	30.2±5.3 a	-

Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments.

7. ARTIGO CIENTÍFICO 3

Submetido ao periódico “Applied Biochemistry and Biotechnology”

Anti-inflammatory and Antinociceptive Activities of *Bauhinia monandra* Leaf Lectin (BmoLL)

Janaína Karin de Lima Campos; Chrisjacele Santos Ferreira de Araújo; Tiago Ferreira da Silva Araújo; Vera Lúcia de Menezes Lima and Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária - CEP 50.670-901 - Recife – PE – Brazil.

Correspondence should be addressed to Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho; lcbbcoelho@gmail.com

ABSTRACT

Bauhinia monandra, a plant popularly known in Brazil as “cow's hoof” is widely used in folk medicine, contain a leaf galactose-specific lectin (BmoLL). This study aimed to evaluate the potential anti-inflammatory and antinociceptive activity of BmoLL in mice. The lectin was purified through ammonium sulfate fractionation followed by guar gel affinity chromatography column. Anti-inflammatory activity was evaluated by 1% carrageenan-induced inflammation in mice treated with pure BmoLL (15, 30 and 60 mg/kg, i.p.). Acetic acid-induced abdominal writhing and hot plate methods evaluated antinociceptive activity. BmoLL significantly inhibited the carrageenan-induced paw edema by 47% (30 mg/kg) and 60.5% (60 mg/kg); acetylsalicylic acid showed 70.5% inhibition, in comparison to controls. In a dose-dependent manner, BmoLL leukocyte migration was significantly reduced; in mice treated with acetylsalicylic acid the decrease in leukocyte migration was similar to BmoLL with 15 mg/kg. BmoLL at doses of 15, 30 and 60 mg/kg significantly reduced the number of animal contortions by 43.1, 50.1 and 71.3%, respectively. The lectin (30 and 60 mg/kg) showed a significant effect in the hot plate assay. BmoLL anti-inflammatory and antinociceptive effects were dose-dependent; the lectin potent properties may have potential as a natural product for pharmacological purposes.

Key words: *Bauhinia monandra*; leaf lectin; anti-inflammation; galactose-specific lectin; paw edema; analgesic potential.

INTRODUCTION

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immunogenic origin that possess carbohydrate-binding sites able to interact reversibly and specifically with sugars through hydrogen bonding, hydrophobic interactions and Van der Waals forces (Kennedy et al., 1995; Coelho et al., 2012). These proteins are molecules of recognition ability within a cell, between cells or organisms, and play important physiological roles. Studies focusing on the applications of plant lectins have identified biological activities that may confer diverse pharmacological properties to pure preparations obtained from several vegetal parts such as, seeds, bark or leaves (Santos et al., 2013). Lectins, among other activities, can be insecticide (Macedo et al., 2007; Araújo et al., 2012; Agra-Neto et al., 2013; Paiva et al., 2013), antifungal (Vaz et al., 2009), antiviral (Sharma et al., 2009), antibacterial (Oliveira et al., 2008; Costa et al., 2010), antiproliferative (Aranda-Souza et al., 2014), antiplatelet aggregation (Ganguly & Fossett, 1981; Silva et al., 2012), anti-diabetic (Rocha et al., 2013), antiparasite (Fernandes et al., 2010), wound healing (Coriolano et al., 2014), analgesic (Leite et al., 2012) and anti-inflammatory (Araújo et al., 2013a). A large amount of lectin proteins are found in Leguminosae plants, mainly in the subfamilie Papilionoideae, but few lectins are from subfamilies Caesalpinioideae and Mimosoideae (Silva et al., 2007; Pinto et al., 2008).

The genus *Bauhinia* (Caesalpinioideae) is largely found in tropical regions, including Africa, Asia and South America, and in Brazil, this plant is known as “cow's hoof” due to its leaf shapes (Coelho & Silva, 2000). Plants from this genus acted as anti-diabetic agents (Fuentes et al., 2004) and prolonged blood clotting (Oliva et al., 2010). The *Bauhinia* lectins have been isolated from *B. purpurea* (Young et al., 1985), *B. monandra* (Coelho & Silva, 2000; Souza et al., 2011), *B. pentandra* (Silva et al., 2001), *B. variegata* (Lin & Ng, 2008; Pinto et al., 2008), *B. bauhinioides* (Silva et al., 2011) and *B. forficata* (Silva et al., 2012).

Coelho and Silva (2000) were the first to report the presence of a lectin (BmoLL) in the leaves of *B. monandra*, which are able to bind specifically and reversibly to galactose. Souza et al. (2011) obtained another galactose-specific lectin (BmoRoL) from *B. monandra* secondary roots with termiticidal activity on *Nasutitermes corniger* and antifungal activities against phytopathogenic species of *Fusarium*. Previous studies have reported some biological activities of BmoLL, such as insecticidal action (Macedo et al., 2007), but to the best of our knowledge there is no information about the pharmacological activity of this lectin. Thus, the present study aimed to investigate the anti-inflammatory and antinociceptive potential of BmoLL.

MATERIALS AND REAGENTS

Chemicals and Reagents

Acetylsalicylic acid (ASA), propylene glycol, and λ -carrageenan were purchased from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Acetic acid, ether, chloroform, acetone, methanol and other solvents were from Merck (Darmstadt, Germany).

Sample Collection and BmoLL Purification

A voucher specimen of *B. monandra*, number 57462, is available at the Herbarium “Dárdano de Andrade Lima” of the “Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA”, from Recife, PE, Brazil. Briefly, *B. monandra* leaves were collected from ornamental trees in the city of Recife, washed with distilled water, dried at 28 °C for 2-3 days, powdered, and extracted (10%, w/v) at 4°C for 16 h in 10 mM citrate phosphate buffer containing 150 mM

NaCl, pH 6.5. The extract was fractionated with ammonium sulfate (60% saturation) at 28 °C for 4 h; after centrifugation (12,000 x g, 4 °C, 15 min), the precipitate was resuspended in distilled water and dialyzed in the buffer. The sample was applied into a guar gel affinity column made with guar gum (Guaran; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), which was previously equilibrated with the buffer. After removing the unbound fraction, BmoLL was eluted with 330 mM galactose in the buffer (2mL/6 min), according to the procedure described by Coelho and Silva (2000). Hemagglutinating activity of BmoLL was evaluated according to Coelho et al (2012), protein concentration was quantified (Lowry et al., 1951) and the purified lectin was stored at -20 °C.

Animals

Male Swiss white mice (*Mus musculus*), 60 days old, weighing 30 ± 5 g were obtained from the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA) from the Federal University of Pernambuco (UFPE). The animals were separated into groups (N = 6) and housed in cages at a constant temperature of 22 ± 2 °C, with 12 h dark-light cycle, with free access to standard chow (Labina, Agribands Brazil Ltd.) and water *ad libitum*. The animals were fasted for 4 h prior use for determination of anti-inflammatory and antinociceptive activities.

All experimental procedures were performed according to the guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, and the study was approved by the Ethics Committee for Animal Care and Use (CEUA) of the Bioscience Center of UFPE (Of. number 259/10).

Assay of Anti-inflammatory Activity by Carrageenan-induced Edema

Carrageenan was used to induce mice paw edema, as one of the two assays to evaluate the anti-inflammatory effect of BmoLL. The mice paw edema was induced by the injection of freshly prepared solution of 1% carrageenan (0.1 ml) in 0.9% NaCl, into the sub plantar tissue of the right-hind paw of each mouse, half hour prior to intraperitoneal administration of BmoLL (Winter et al., 1962). Lectin doses were chosen according to a pilot experiment; 3 groups of animals (N = 6) were treated with 15, 30 and 60 mg/kg BmoLL (i.p.), a positive control group received 100 mg/kg acetylsalicylic acid (ASA), and the negative control group received just vehicle (0.9% NaCl).

The paw volume was measured by one caliper rule (Kanon- Stainless Steel) at 0, 1, 2, 3 and 4 h immediately after the sub plantar injection of carrageenan, and the data obtained for each animal were recorded. Increase in paw thickness measured the difference in paw at 0 h and at the respective experimental hours. The results obtained for the various groups were reported as mean $\pm$ SD and expressed in millimeter. The percentage of inflammation inhibition was calculated using the following equation: inhibition of inflammation (%) = [(Vf-Vi) control group mean – (Vf-Vi) test group mean / (Vf-Vi) control group mean] x 100, where Vf and Vi represent the initial and final paw thickness, respectively.

Assay of Anti-inflammatory Activity by Carrageenan-induced Peritonitis

Peritonitis was evaluated as described by Foster et al. (1986). Groups of animals (N=6) were deprived of food overnight, pre-treated intraperitoneally with 0.9% NaCl (negative control), ASA (positive control, 100 mg/kg) and BmoLL (15, 30 and 60 mg/kg), and after 1 h the animals received an intraperitoneal (i.p.) injection of 1% carrageenan (1 mL). Four hours after the carrageenan injection the animals were sacrificed by cervical dislocation, and saline

(2 mL) containing 1 mM EDTA was injected into the peritoneal cavity, immediately a brief massage was done; the peritoneal exudate was withdrawn and used for total leukocyte cell, mainly neutrophils, counting in a Cell Counter (ABX MICROS 60). The results expressed the number of leukocytes $\times 10^3/\text{mm}^3$.

Assay of Antinociceptive Activity by Acetic Acid-induced Abdominal Writhing

Abdominal writhing based of a contraction from the abdominal muscle together with a stretching, induced by agent nociceptive (0.8% acetic acid) with intraperitoneal injection (Koster et al., 1959). Groups of male mice received intraperitoneal injection of BmoLL (15, 30 and 60 mg/kg), ASA (100 mg/kg) and saline (control group) 1 h prior to administration of acetic acid (0.8%, i.p.). The number of writhing reflexes was counted for 20 min. A significant reduction of writhes in animals treated with BmoLL compared to those in the control group was considered as an antinociceptive response.

Assay of Antinociceptive Activity by Hot plate test

The central analgesic activity against thermal stimuli applied the hot plate test (MacDonald et al., 1946). The animals were individually placed in a hot plate heated at $55 \pm 1.0^\circ\text{C}$ and response to the stimulus was measured at time 0, 30, 60, 90, and 120 min after the first thermal stimulus. The maximum stay of the animal on the hot plate was 60 s to avoid damage. A control group was treated with saline, another group with morphine (1 mg/kg, i.p.), and the assayed groups received BmoLL (15, 30 and 60 mg/kg; i.p.) 1 h before performing experiments.

Statistical analysis

The results obtained for the various groups were as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical evaluation was carried out by one-way analysis of variance ANOVA, followed by Tukey's *post hoc* test with the significance level set at $P < 0.05$ using PRISMA (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, version 5.01).

RESULTS

Anti-inflammatory Activity by Carrageenan-induced Paw Edema and Carrageenan-induced Peritonitis

Figure 1 shows the effect of BmoLL on paw edema induced by carrageenan in mice. Injection of carrageenan into the hind paw induced a progressive edema. Administration of BmoLL showed a significant ($P < 0.05$) anti-inflammatory effect by reducing the paw edema in a dose dependent manner. BmoLL inhibited 47% and 60.5% the inflammation at the concentrations of 30 and 60 mg/kg, respectively. Treatment of the animals with ASA reduced 70% the paw edema.

The induction of inflammation with carrageenan into the peritoneal cavity caused a migration of leukocytes. In a dose-dependent manner, BmoLL leukocyte migration significantly reduced when compared with the control group (saline), as shown in Figure 2. In the peritoneal fluid of the group treated with ASA (100 mg/kg) there was a decrease in leukocyte cellular migration, similar to BmoLL group treated with 15 mg/kg.

Antinociceptive Activity by Acetic Acid-induced Abdominal Writhing and by Hot Plate Test

The administration of BmoLL in different concentrations (15 – 60 mg/kg) showed a significant reduction (43.1 – 71.3%) in the writhing induced by acetic acid administration, compared with the control group treated with saline (Figure 3) but relatively less than compared to ASA (100 mg/kg). A significant decrease by 92.7% of writhing occurred in the group treated with ASA, the positive control for anti-nociception.

Figure 4 shows the analgesic response of groups treated with the various concentrations of BmoLL. The group of mice treated with a dose of 30 and 60 mg/kg (i.p.) of BmoLL showed a significant analgesic response ($P < 0.001$) compared to control (saline), in the form of increased reaction time of mice to jump or lick paws in MacDonald et al. (1946) hot plate method after 90 min. The result with 60 mg/kg BmoLL was similar to that observed for the group treated with the standard drug (morphine 1 mg/kg) after 90 and 120 min. There was no analgesic response for the group treated with low dose of BmoLL (15 mg/kg).

DISCUSSION

Carrageenan-induced paw edema is a most-valuable model to investigate anti-inflammatory effect of natural and chemical products. Inflammatory reactions, characterized by vascular and cellular events, have an important role in the activation of cyclooxygenase (COX) resulting in the release of inflammatory mediators such as prostaglandins and leukotrienes. Considering the significant effect presented by BmoLL to reduce substantially paw edema induced by carrageenan, analyzed at different times, we can assume that this lectin may have inhibitory action on the release of inflammatory mediators.

The anti-inflammatory activity of BmoLL corroborate with the lectin purified from the seeds of *Clitoria fairchildiana* (CFAL), which showed anti-inflammatory activity of 64% on paw edema induced by carrageenan (Leite et al., 2012). Previous studies showed that some lectins have anti-inflammatory activity by reducing the rolling and adhesion of neutrophils on the endothelium, which may possibly be due to a competitive inhibition of glycosylated selectin binding sites on the membranes of leukocytes and endothelial cells. Thus, it is suggested that lectins can inhibit the vascular inflammation mediated by adhesion of immune cells (Assereuy et al., 1997; Rocha et al., 2011). Therefore, we can suppose that the anti-inflammatory potential of BmoLL may be a result of vascular inflammation inhibition by adhesion of immune cells to endothelium.

In addition to the vascular inflammation processes, the migration of leukocytes is a key factor for promoting the inflammatory process (Napimoga et al., 2007). Thus, by using the model of peritoneum inflammation to evaluate the migration of leukocytes in inflammatory response it was demonstrated in this study that BmoLL significantly reduced cell infiltration in all assayed doses. Experimental studies have demonstrated the inhibition of leukocyte migration by different anti-inflammatory mechanisms. Napimoga et al. (2007) demonstrated that *Lonchocarpus sericeus* lectin decreased leukocyte migration and inflammatory response via inhibition of cytokine and chemokine production. In this context, lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds promotes reduction of inflammation by inhibiting adhesion and rolling of leukocytes, and modulates histamine and prostaglandins (PEG2) in inflammation animal models (Alencar et al., 2010). Therefore, we can suppose that the peritoneum inflammation inhibition mediated by administration of BmoLL may be a result of reduction of cytokines and chemokines release involved with the leukocytes migration.

The experimental model of writhing by injecting an irritant product such as acetic acid in mice is a chemical method used to assess nonspecific central and peripheral analgesic

activity (Dannerman, 1977) of the test product, which infers from the reduction in writhing frequency. There will be an increase in the peritoneal fluid by inducing the release of chemical mediators and therefore a direct stimulus via activation of chemo sensitive nociceptors (Zhang et al., 2005). Therefore, the analgesic effect presented by BmoLL may be due to the anti-inflammatory effect in the inhibition of these mediators.

Recently, studies have shown that plant lectins can display antinociceptive effect via lectin domain interaction (Leite et al., 2012). Considering the clear association between inflammatory processes and development of pain, a classical sign of inflammation, the BmoLL antinociceptive effects may be associated directly with decreasing inflammation. Lectins from *Lonchocarpus sericus* and *Canavalia boliviana* show antinociceptive activity associated with inhibitory effects on leukocyte migration and hypernociception via inhibition of cytokine and chemokine production (Napimoga et al., 2007; Figueiredo et al., 2009).

On the other hand, model nociception from a thermal stimulus is commonly used for evaluating the central analgesic effect. In the present work, we could observe that BmoLL was able to increase the latency time and the best result was found when the animals were treated with the higher dose (30 and 60 mg/kg). Consistent with the findings reported here, other studies with lectins obtained from *Brythamnion seaforthii* (Vieira et al., 2004), *Canavalia boliviana* (Figueiredo et al., 2009), and *Canna limbata* (Araújo et al., 2013b) observed a significant increase in the latency time of animals on the hot plate. In this method, the thermal sensation stimulates sensory fibers run through synapses to the cortex, resulting in the perception of warmth. We report that antinociceptive activity of BmoLL is already associated with peripheral analgesic activity. Our findings may also be attributed to a direct BmoLL effect on specific central nervous system receptors related to opioid molecules which may act as an antagonist binding to stereo specific and saturable receptor sites in the brain, spinal cord and other tissues, providing the relieve of pain, as proposed by Pires et al. (2013)

with *Canavalia brasiliensis* lectin. Therefore, our study demonstrates that BmoLL have antinociceptive effect not only on the peripheral system, but also on the central nervous system. Moreover, reinforcing the hypothesis that antinociceptive response of lectin may be explained by their specificity for different sugars, which could enhance the lectin-carbohydrate interaction and cell receptors.

CONCLUSIONS

BmoLL has potent anti-inflammatory and antinociceptive properties and this could explain the basis for the use of *B. monandra* in folk medicine. Furthermore, the results provided experimental evidence for the effectiveness of the traditional use of *B. monandra* in treating diseases associated with inflammation and pain, and that BmoLL may have potential as a natural anti-inflammatory product for pharmacological purposes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants and fellowships (VLML and LCBBC). Also, the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) are acknowledged for financial support.

REFERENCES

- Agra-Neto, A.C., Napoleão, T.H., Pontual, E.V., Santos, N.D.L., Luz, L.A., Oliveira, C.M.F., Melo-Santos, M.A.V. and Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G. (2014) *Parasitol. Res.* 113, 175-184.
- Alencar, N.M.N., Oliveira, R.S.B., Figueiredo, J.G., Cavalcante, I.J.M., Matos, M.P.V., Cunha, F.Q., Nunes, J.V.S., Bomfim, I.R. and Ramos, M.V. (2010) *Inflamm. Res.* 56, 245–254.
- Aranda-Souza, M.A., Rossato, F.A., Costa, R.A.P., Figueira, T.R., Castilho, R.F., Guarniere, M.C., Nunes, E.S., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S. and Vercesi, A.E. (2014) *Toxicon.* 82, 97-103.
- Araújo, L.C.C., Aguiar, J.S., Napoleão, T.H., Mota, F.V.B., Barros, A.L.S., Moura, M.C., Coriolano, M.C., Coelho, L.C.B.B., Silva, T.G. and Paiva, P.M.G. (2013a) *PLoS ONE* 8(12), e81973.
- Araújo, R.M.S., Ferreira, R.S., Napoleão, T.H., Carneiro-da-Cunha, M.G., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., Oliva, M.L.V. and Paiva, P.M.G. (2012) *Plant Science.* 183, 20-26.
- Araújo, T.S., Teixeira, C.S., Falcão, M.A.P., Pinto Junior, V.R., Santiago, M.Q., Benevides, R.G., Delatorre, P., Martins, J.L., Alexandre-Moreira, M.S., Cavada, B.S., Campesato, E.A. and Rocha, B.A.M. (2013b) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171, 1944-1955.
- Assreuy, A.M., Shibuya, M.D., Martins, G.J., Souza, M.L.P., Cavada, B.S., Moreira, R.A., Oliveira, J.T.A., Ribeiro, R.A. and Flores, C.A. (1997) *Mediators Inflamm.* 6, 201-210.
- Coelho, L.C.B.B. and Silva, M.B.R. (2000) *Phytochem. Anal.* 11, 295–300.
- Coelho, L.C.B.B., Santos, A.F.S., Napoleão, T.H., Correia, M.T.S. and Paiva, P.M.G. (2012) *Protein Purification by Affinity Chromatography.* Chapter 3, 53-72. Nova Science Publisher Inc.

- Coriolano, M.C., Melo, C.M.L., Silva, F.O., Schirato, G.V., Porto, C. S., Santos, P.J.P.,
Correia, M.T.S., Porto, A.L.F., Carneiro-Leão, A.M.A. and Coelho, L.C.B.B. (2014)
Appl. Biochem. Biotechnol. 172, 2682-2693.
- Costa, R.M.P.B., Vaz, A.F.M.; Oliva, M.L.V., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S. and
Carneiro-Da-Cunha, M.G. (2010) *Process Biochem.* 45, 526-533.
- Dannerman, P.J. (1977) Monitoring of analgesia in anesthesia and analgesia in laboratory
animals. pp. 83–99. Ch. 6 (Kohn DK, Sally K, Wixson B, White WJ, John G. Eds.)
Academic Press USA.
- Fernandes, M.P., Inada, N.M., Chiaratti, M. R., Araújo, F.F.B., Meirelles, F.V., Correia,
M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Alves, M.J.M., Gadelha, F.R. and Vercesi, A.E. (2010) *J.*
Bioenerg. Biomembr. 42, 69-78.
- Figueiredo, J.G., Bitencourt, F.S., Beserra, I.G., Teixeira, C.S., Luz, P.B., Bezerra, E.H.,
Mota, M.R., Assreuy, A.M., Cunha, F.Q., Cavada, B.S., Alencar, N.M. (2009) *Naunyn-*
Schmied. Arch. Pharmacol. 380, 407–414.
- Foster, M.E., Johnson, C.D., Bilings, P.J., Davies, P.W. and Leaper, D.J. (1986) *Dis. Colon*
Rectum. 29, 255-259.
- Fuentes O., Arancibia-Avila, P. and Alan, J. (2004) *Fitoterapia.* 75, 527–532.
- Ganguly, P. and Fossett, N.G. (1981) *Blood.* 57, 343–352.
- Kennedy, J.F., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Cavalcanti, M.S.M. and Coelho, L.C.B.B.
(1995) *Carbohydr. Polym.* 26, 219–230.
- Koster, R., Anderson, M. and Beer, E.J. (1959) *Fed. Proc.* 18(1), 412-416.
- Leite, J.F.M., Assreuy, A.M.S., Mota, M.R.L., Bringel, P.H.S.F., Lacerda, R.R., Gomes,
V.M., Cajazeiras, J.B., Nascimento, K.S., Pessoa, H.L.F., Gadelha, C.A.A., Delatorre,
P., Cavada, B.S. and Santi-Gadelha, T. (2012) *Molecules.* 17, 3277-3290.

- Lin, P. and Ng, T.B. (2008) *J. Agric. Food. Chem.* 56, 10481–10486.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- MacDonald, A. D., Woolfe, G., Bergel, F., Morrison, A., Paroli, E. and Rinderknecht, H. (1946) *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 1, 4-14.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Silva, M.B.R. and Coelho, L.C.B.B. (2007) *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146, 486–498.
- Napimoga, M.H., Cavada, B.S., Alencar, N.M., Mota, M.L., Bittencourt, F.S., Alves-Filho, J.C., Grespan, R., Gonçalves, R.B., Clemente- Napimoga, J.T., Freitas, A., Parada, C.A., Ferreira, S.H. and Cunha, F.Q. (2007) *Int. Immunopharmacol.* 7, 824–835.
- Oliva, M.L.V., Silva, M.C.C., Sallai, R.C., Brito, M.V. and Sampaio, U.M. (2010) *Biochimie.* 92, 1667–1673.
- Oliveira, M.D.L., Andrade, C.A.S., Santos-Magalhães, N.S., Coelho, L.C.B.B., Teixeira, J.A.C., Carneiro-da-Cunha, M.G. and Correia, M.T.S. (2008) *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 371-376.
- Paiva, P.M.G., Pontual, E.V., Napoleão, T.H. and Coelho, L.C.B.B. (2013) Larvae of pests and vectors as targets of plant lectins and trypsin inhibitors. Chapter 2, 7-10. In: *Lectins and trypsin inhibitors from plants: Biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae.* Nova Science Publishers Inc.
- Pinto, L.S., Nagano, C.S., Oliveira, T.M., Moura, T.R., Sampaio, A.H., Debray, H., Pinto, V.P., Dellagostin, O.A. and Cavada, B. S. (2008) *J. Biosci.* 33, 355–363.
- Pires, A.F., Assreuy, A.M., Lopes, E.A., Celedônio, N.R., Soares, C.E., Rodrigues, N.V., Sousa, P.L., Benevides, R.G., Nagano, C.S., Cavada, B.S.; Leal-Cardoso, J.H., Coelho-de-Souza, A.N. and Santos, C.F. (2013) *Fundam. Clin. Pharmacol.* 27, 201-209.

- Rocha, A.A., Araújo, T.F.S., Fonseca, C.S.M., Mota, D.L., Medeiros, P.L., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S. and Lima, V.L.M. (2013) *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013, 1-9.
- Rocha, B. A. M., Delatorre, P., Oliveira, T. M., Benevides, R. G., Pires, A. F., Souza, A. S., Souza, L. A. G., Assereuy, A. M. S., Debray, M. H., Azevedo, W. F., Sampaio, A. H. and Cavada, B. S. (2011) *Biochimie.* 93, 806–816.
- Santos, A.F.S., Napoleão, T.H., Bezerra, R.F., Carvalho, E.V.M.M., Correia, M.T.S., Paiva, P.M.G. and Coelho, L.C.B.B. (2013) *Advances in Medicine and Biology.* 63, 33-60. Ed. Leon V. Berhardt. Nova Science Publishers Inc.
- Sharma, A., Ng, T.B., Wong, J.H. and Lin, P. (2009) *J. Biomed. Biotechnol.* 929, 568–576.
- Silva, A.L.C., Horta, A.C.G. and Moreira, R.A. (2001) *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 13, 262–269.
- Silva, H.C., Bari, A.U., Pereira-Junior, F.N., Simoes, R.C., Barroso-Neto, I.L., Nobre, C.B., Preira, M.G., Nascimento, K.S., Rocha, B.A., Delatorre, P., Nagano, C.S., Assereuy, A.M. and Cavada, B.S. (2011) *Protein Pept. Lett.* 18, 396–402.
- Silva, J.A., Damico, D.C.S., Baldasso, P.A., Mattioli, M.A., Winck, F.V., Fraceto, L.F., Novello, J.C. and Marangoni, S. (2007) *Protein J.* 26, 193-201.
- Silva, M.C.C., Santana, L.A., Mentele, R., Ferreira, R.S., Miranda, A., Silva-Lucca, R.A., Sampaio, M.U., Correia, M.T.S. and Oliva M.L.V. (2012) *Proc. Biochem.* 47, 1049–1059.
- Souza, J.D., Silva, M.B.R., Argolo, A.C.C., Napoleão, T.H., Sá, R.A., Correia, M.T.S., Paiva, P.M.G., Silva, M.D.C. and Coelho, L.C.B.B. (2011) *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 65, 696-702.
- Vaz, A.F.M., Costa, R.M.P.B., Melo, A.M.M.A., Oliva, M.L.V., Santana, L.A., Silva-Lucca, R.A., Coelho, L.C.B.B. and Coreia, M.T.S. (2009) *Food Chem.* 119, 1507–1513.

Vieira, L.A.P., Freitas, A.L.P., Feitosa, J.P.A., Silva, D.C. and Viana, G.S.B. (2004) Braz. J. Med. Biol. Res. 37, 1071-1079.

Winter, C.A., Risley, E.A. and Nuss, G.W. (1962) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 544-547.

Young, N.M., Watson, D.C. and Williams, R.E. (1985) Fed. Eur. Biochem. Soc. 182, 403–406.

Zhang, S., Wong, Y.R., Ong, C.N. and Shen, H.M. (2005) Current Medicinal Chemistry. Anticancer Agents. 5, 239-249.

Figure captions

Figure 1. Effect of BmoLL in the thickness of the right posterior edema of mice. ASA, acetylsalicylic acid. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significant difference in comparison to the control group: *P<0.05.

Figure 2. Effect of BmoLL in the leukocyte migration in the model of carrageenan-induced peritonitis. ASA, acetylsalicylic acid. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significant difference in comparison to the control group: *P<0.0001.

Figure 3. Effect of BmoLL in the number of writhes in the model of nociception induced by acetic acid. ASA, acetylsalicylic acid. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significant difference in comparison to the control group: *P<0.0001.

Figure 4. Analgesic effect of BmoLL in latency time in the hot plate assay on mice. ASA, acetylsalicylic acid. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significant difference in comparison to the control group: *P<0.001.

Figure 1

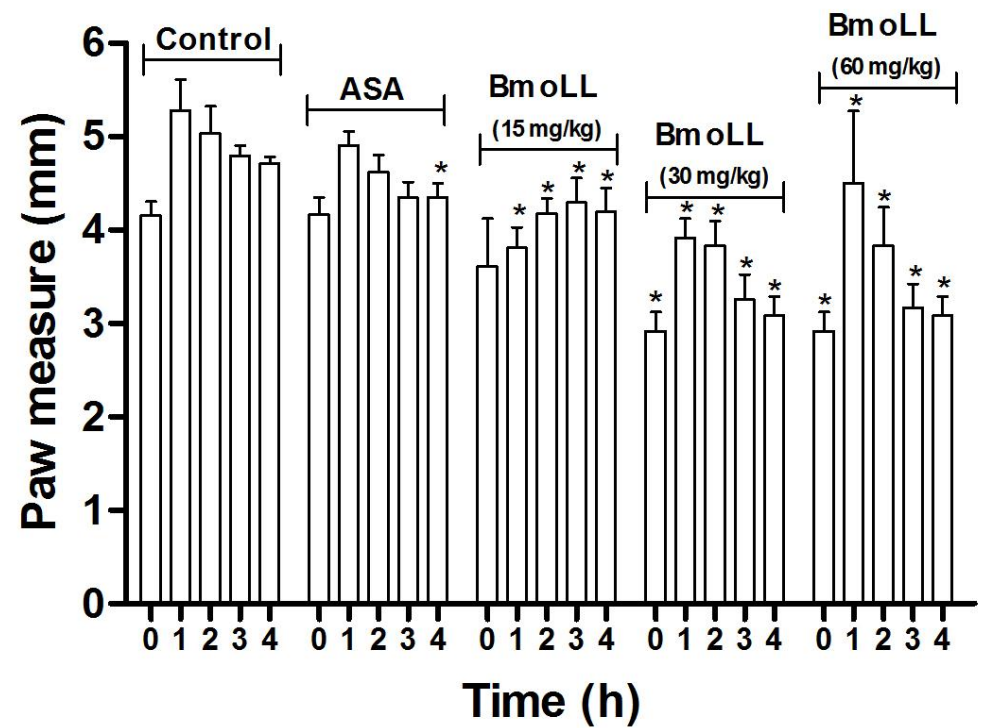


Figure 2

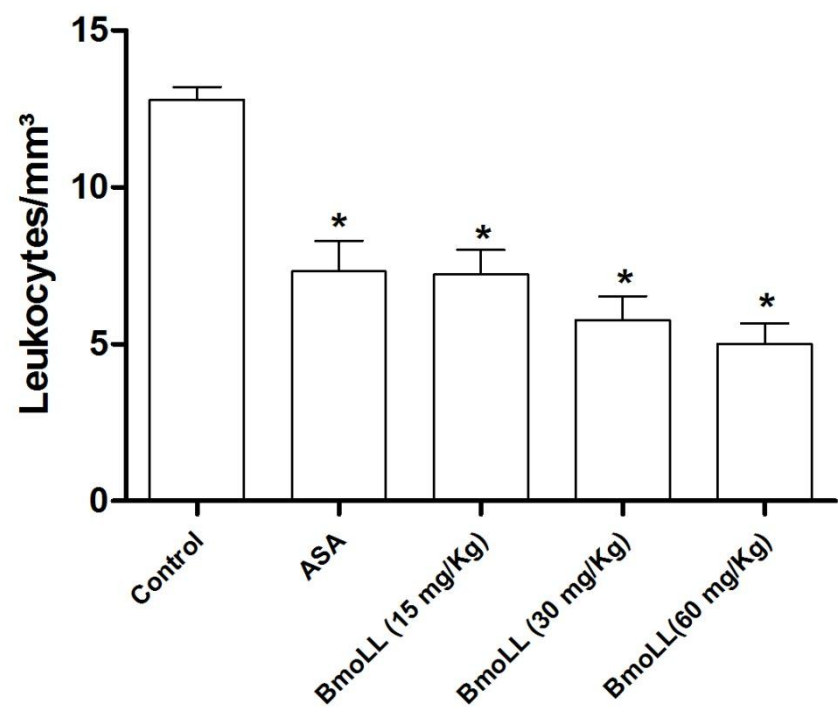


Figure 3

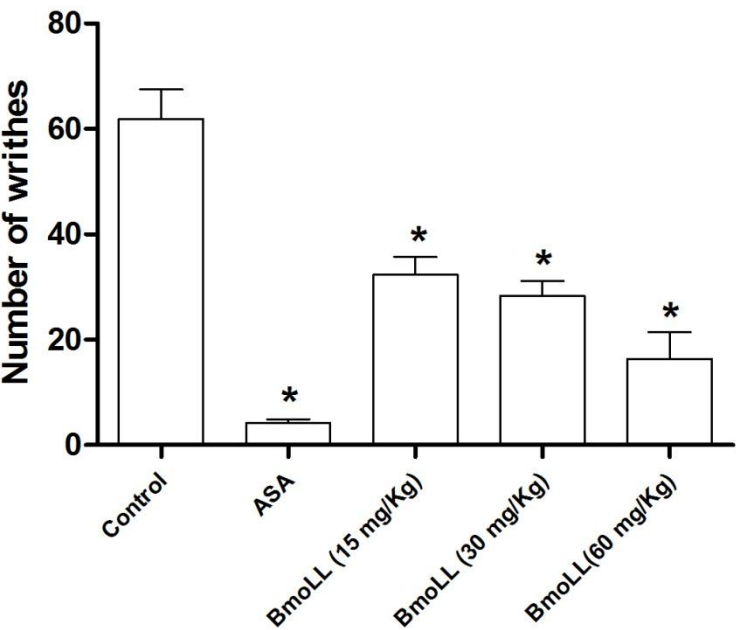
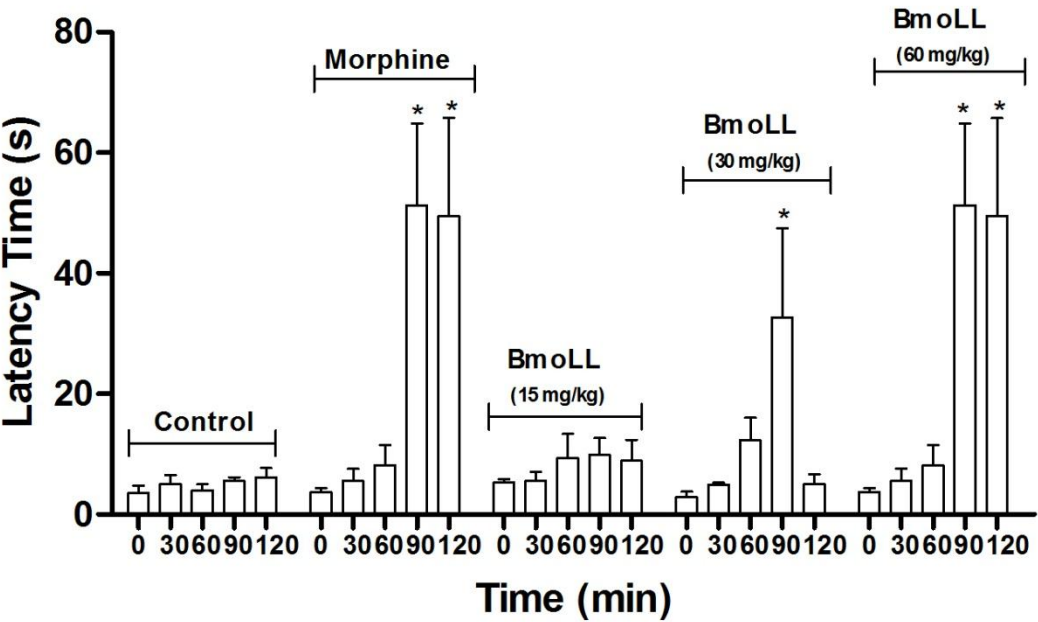


Figure 4



8. CONCLUSÃO

BmoLL é uma molécula interessante para ser estudada mais profundamente quanto ao seu potencial farmacológico, desde que não apresentou toxicidade aguda para camundongos não induziu a morte nem perda de peso na dose de 2000 mg/kg de peso corporal como também não afetou a sobrevivência de *A. salina* nas concentrações ensaiadas (250-1,000ug/mL).

Interessante também sua atividade hipoglicemiante onde BmoLL além de reduzir os níveis de glicose no sangue de camundongos NOD diabéticos para níveis normoglicêmicos, também minimizou complicações como dislipidemia e perda de peso. Também apresentou propriedades antinociceptivas nos testes de contorção abdominal e placa quente, anti-inflamatórias nos testes de edema de pata e peritonite.

BmoLL demonstrou possíveis atividades biológicas potentes nos diversos testes realizados, além de não apresentar toxicidade, sendo interessante como produto natural para fins farmacológicos, sendo necessário estudo para compreensão dos mecanismos de ação.