

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

**Ana Carina Cavalcanti de Freitas**

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PREPARAÇÕES OBTIDAS DE *Libidibia***  
**(*Caesalpinia ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz**

**RECIFE**

**2012**

**Ana Carina Cavalcanti de Freitas**

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PREPARAÇÕES OBTIDAS DE *Libidibia*  
(*Caesalpinia*) *ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Luiza Vilela  
Oliva (UNIFESP)

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Maria Tereza dos  
Santos Correia (UFPE)

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Freitas, Ana Carina Cavalcanti de**  
Atividades biológicas de preparações obtidas de *Libidibia*  
(*Caesalpinia ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz/ Ana Carina  
Cavalcanti de Freitas– Recife: O Autor, 2012.

140 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Luiza Vilela Oliva

Coorientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,  
Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia, 2012.

Inclui bibliografia

1. **Caesalpiniaceae 2. Lectinas 3. Plantas medicinais I. Oliva, Maria Luiza Vilela (orientadora) II. Correia, Maria Tereza dos Santos (coorientadora) III. Título**

583.749

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 044

**Ana Carina Cavalcanti de Freitas**

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PREPARAÇÕES OBTIDAS DE *Libidibia*  
(*Caesalpinia ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia.

**Recife, 18 de dezembro de 2012.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva (UNIFESP – orientadora)

---

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (UFPE – co-orientadora)

---

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva (UFPE)

---

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (UFPE)

---

Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha (UFPE)

---

Prof. Dr. Antônio Fernando de Melo Vaz (UFPE)



*Dedico aos meus pais e ao meu marido*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Criador de tudo, responsável pela beleza e complexidade da natureza, a qual exaustivamente tentamos compreender. Obrigada por tudo que tenho conquistado e por estar sempre comigo!

Às Profas. Dras. Maria Luíza Vilela Oliva (orientadora) e Maria Tereza dos Santos Correia (co-orientadora), pela oportunidade dispensada e pela compreensão, principalmente nos últimos momentos do doutorado.

À aluna de Biomedicina, minha querida IC, Mariana Cavalcanti Ramos, que foi meus braços direito e esquerdo nesse projeto; a principal responsável por tudo dar certo! Uma pessoa iluminada, que deu o toque de Midas nos experimentos e trouxe alegria ao nosso lab... Com toda sua determinação, dedicação e garra para o trabalho, pode ser considerada uma “co-doutoranda”! Sem falar no seu temperamento forte e seu humor inigualável!!! Obrigada amiga!!! Sua “chefia” agradece de coração, por tudo que você fez!!!

À Coordenação e professores do Doutorado em Ciências Biológicas e aos funcionários, professores e alunos dos Departamentos de Bioquímica, Biofísica e Radiobiologia e Antibióticos, este último principalmente na pessoa da profa. Teresinha Gonçalves da Silva, pelo empenho e ajuda.

A todos os meus amigos do Laboratório de Glicoproteínas, especialmente Rayana Apolinário, Mychely Melo, Kézia Moura, Chisjacele e Mary Aranda, pela ajuda dedicada. Agradecimento especial a Thiago Henrique, que me ajudou na parte estatística. Agradeço também a Túlio Diego, pelas análises realizadas! Muito obrigada, gente!!!

Aos meus familiares, pela confiança e pelo amor dispensados; e ao meu marido e amor da minha vida, Flávio Henrique, que me apoiou em todos os momentos, dando-me força e estímulo para continuar até o fim.

Aos amigos, muitas vezes negligenciados pela falta de tempo devido à dedicação exclusiva a esta tese... Agradeço pela compreensão...

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

Enfim, obrigada a todos que tornaram este trabalho possível, direta ou indiretamente.

*“As letras e a ciência só tomarão seu verdadeiro lugar na obra do desenvolvimento humano no dia em que, livres de toda a servidão mercenária, forem exclusivamente pelos que as amam e para os que as amam.”*

Piotr Kropotkine  
1842 // 1921

## RESUMO

As plantas constituem uma importante fonte de produtos naturais ativos. Dentre os metabólitos primários vegetais, estão as lectinas, proteínas ubíquas na natureza que se ligam de forma específica e reversível a carboidratos, o que lhes permite várias aplicações biotecnológicas. *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia*, popularmente conhecida como “pau-ferro”, é uma árvore largamente distribuída no Brasil utilizada na medicina popular devido às suas numerosas propriedades terapêuticas. O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades biológicas (atividades citotóxica, antitumoral, anti-inflamatória, analgésica, artemicida e moluscicida) de preparações obtidas de *L. ferrea*, visando empregá-las como fitofármacos ou agentes de controle biológico. Na avaliação da atividade anti-inflamatória, o extrato etanólico da vagem (EECf, 50 mg/kg) reduziu significativamente o edema de orelha (66,6%) em relação ao controle, inibiu a permeabilidade vascular induzida por ácido acético, e a migração de leucócitos polimorfonucleares para a cavidade peritoneal induzida pelo tioglicolato. No teste de contorções induzidas por ácido acético, EECf (12,5; 25 e 50 mg/kg) reduziu significativamente o número de contorções em 24,9%; 46,9% e 74,2%, respectivamente. No teste de formalina, EECf apresentou efeitos nociceptivos apenas na segunda fase, relacionada à dor inflamatória. O extrato bruto aquoso da vagem (CE) e uma fração proteica obtida por precipitação com sulfato de amônio (F80), ambos em 100 mg/kg, também apresentaram efeito anti-inflamatório significativo, evidenciado pela redução (40,9% e 38,2%, respectivamente) do número de leucócitos no exsudato inflamatório, na peritonite induzida por carragenina. Ambos os preparados provocaram um decréscimo significativo nas concentrações de óxido nítrico e reduziram em 56,60% e 72,72%, respectivamente, o número de contorções induzidas por ácido acético, demonstrando forte ação antinociceptiva destas preparações. Na atividade citotóxica, as preparações não inibiram o crescimento nas linhagens celulares testadas. A redução no peso do tumor Sarcoma-180 promovida por F80 também não foi significativa (8,68%, 100 mg/kg peso corporal). A LD<sub>50</sub> para ambos os preparados ficou estabelecida em 2.500 mg/kg peso corporal. As lectinas CfePL, CfeBL e CfeLL, obtidas respectivamente das vagens, entrecasca e folhas, foram testadas em diferentes concentrações (12,5; 25; 50 e 100 ppm), quanto às suas atividades artemicida (frente à *Artemia salina*) e embriotóxica (contra embriões de *Biomphalaria glabrata*). Quanto à atividade artemicida, todas as lectinas testadas promoveram a morte de *A. salina*, com LC<sub>50</sub> de 10,728; 25,78 e 54,18 ppm, para CfeLL, CfeBL e CfePL respectivamente. Apenas CfePL e CfeLL apresentaram atividade embriotóxica nas concentrações testadas. As LC<sub>50</sub> de CfeLL e CfePL foram de 36,30 e 94,95 ppm, respectivamente. Em conclusão, CE e F80 não apresentam atividades citotóxica e antitumoral significativas contra as células e o tumor testados; porém, a baixa toxicidade permite seu uso com certa segurança em atividades biológicas ou na medicina popular. Contudo, possuem atividades anti-inflamatória e antinociceptiva promissoras, assim como EECf, corroborando a base farmacológica do uso etnomédico de *L. ferrea*. Os resultados obtidos da atividade artemicida apresentada por CfeLL e CfeBL, além da significativa atividade moluscicida de CfeLL demonstram potenciais aplicações biotecnológicas para estas lectinas.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade; atividade anti-inflamatória; atividade antinociceptiva; lectinas; *Artemia salina*; *Biomphalaria glabrata*

## ABSTRACT

Plants are an important source of natural products. Among the primary plant metabolites there are lectins, proteins ubiquitous in nature which bind reversibly and specifically to carbohydrates, allowing them to various biotechnological applications. *Libidibia* (*Caesalpinia*) *ferrea* var. *parvifolia*, popularly known as “pau-ferro”, is a tree widely distributed in Brazil used in folk medicine due to its numerous therapeutic properties. This study aimed to evaluate the biological properties (cytotoxic, antitumor, anti-inflammatory, analgesic, artemicidal and molluscicidal) of preparations from *L. ferrea* in order to use them as biopharmaceuticals or biological control agents. In the evaluation of anti-inflammatory activity, the ethanol extract of the pod (EECf, 50 mg/kg) significantly reduced the ear edema (66.6%) compared to control, inhibited vascular permeability induced by acetic acid, and the migration of polymorphonuclear leukocytes into the peritoneal cavity induced by thioglycollate. In the test of writhing induced by acetic acid, EECf (12.5; 25 and 50 mg/kg) significantly reduced the number of writhes in 24.9%; 46.9% and 74.2%, respectively. In the formalin test, EECf presented nociceptive effects only in the second phase, related to inflammatory pain. The crude aqueous extract of the pod (CE) and a protein fraction obtained by precipitation with ammonium sulfate (F80), 100 mg/kg both, also showed significant anti-inflammatory effect, as evidenced by the reduction (40.9% and 38.2%, respectively) of the number of leukocytes in inflammatory exudate on carrageenan-induced peritonitis. Both preparations caused a significant decrease in the nitric oxide concentrations and decreased by 56.60% and 72.72%, respectively, the number of writhes induced by acetic acid, showing strong antinociceptive action of these preparations. In cytotoxic activity, preparations did not inhibit growth in cell lines tested. The reduction of Sarcoma-180 tumor weight promoted by F80 was not significant (8.68%, 100 mg/kg body weight). The LD<sub>50</sub> for both preparations was set at 2500 mg/kg body weight. Lectins CfePL, and CfeBL CfeLL obtained respectively from pods, bark and leaves were tested at different concentrations (12.5; 25; 50 and 100 ppm), about their artemicidal (on *Artemia salina*) and embryotoxic (against embryos of *Biomphalaria glabrata*) activities. Regarding to the artemicidal activity, all lectins tested promoted the death of *A. salina*, with LC<sub>50</sub> of 10.728; 25.78 and 54.18 ppm for CfeLL, CfeBL and CfePL respectively. Only CfePL and CfeLL shown embryotoxic activity at the concentrations tested. LC<sub>50</sub> of CfeLL and CfePL were 36.30 and 94.95 ppm, respectively. In conclusion, CE and F80 have no significant cytotoxic and antitumor activities over cell lines and solid tumor tested; otherwise, their low toxicity allows the use of CE and F80 with a certain safety in biological activities or in folk medicine. Although, both preparations present promising anti-inflammatory and antinociceptive activities, even as EECf, corroborating the pharmacological basis of *L. ferrea* ethnomedical use. The results of artemicidal activity displayed by CfeLL and CfeBL, besides the significant molluscicidal activity of CfeLL demonstrate the potential biotechnological applications for these lectins.

**Keywords:** Cytotoxicity; anti-inflammatory activity; analgesic activity; lectins; *Artemia salina*; *Biomphalaria glabrata*

## LISTA DE FIGURAS

<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> – Representação esquemática da hemaglutinação promovida por uma lectina e sua visualização através do ensaio de atividade hemaglutinante.	<b>28</b>
<b>Figura 2</b> – Representação da precipitação salina.	<b>30</b>
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática de uma diálise.	<b>30</b>
<b>Figura 4</b> – Cromatografia de afinidade.	<b>31</b>
<b>Figura 5</b> – Cromatografia de troca iônica.	<b>32</b>
<b>Figura 6</b> – Cromatografia de exclusão molecular ou gel filtração.	<b>33</b>
<b>Figura 7</b> – Eletroforese (SDS-PAGE).	<b>34</b>
<b>Figura 8</b> – Eletroforese bidimensional.	<b>35</b>
<b>Figura 9</b> – Dois espécimes de <i>Artemia salina</i> : macho à esquerda e fêmea à direita.	<b>39</b>
<b>Figura 10</b> – Ciclo de vida de <i>A. salina</i> .	<b>40</b>
<b>Figura 11</b> – Transmissão do <i>S. mansoni</i> .	<b>41</b>
<b>Figura 12</b> – Aspecto geral do molusco <i>Biomphalaria glabrata</i> .	<b>42</b>
<b>Figura 13</b> – Os principais passos na formação da metástase. a) Transformação celular e crescimento tumoral. b) Proliferação de células e vascularização (angiogênese). c) Invasão local do estroma hospedeiro por algumas células tumorais. d) Células tumorais individuais ou agregados celulares caem na corrente sanguínea (ou nos vasos linfáticos), sendo transportados para diversos órgãos. e) As células cancerosas extravasam e estabelecem um microambiente favorável ao seu desenvolvimento. f) Ocorre então a proliferação dentro do parênquima do órgão, concluindo o processo metastático.	<b>50</b>
<b>Figura 14</b> – Representação simplificada do processo inflamatório.	<b>55</b>
<b>Figura 15</b> – Tipos de inflamação na tumorigênese e câncer. Fatores promotores do tumor são apresentados em vermelho e fatores antitumorigênicos em azul.	<b>61</b>
<b>Figura 16</b> – Aspectos gerais da árvore, folhas, flores, frutos, sementes e madeira de <i>Libidibia (Caesalpinia) ferrea</i> var. <i>parvifolia</i> (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz.	<b>66</b>
<b>ARTIGOS</b>	
<b>APÊNDICE A - CAPÍTULO I</b>	
<b>Figure 1.</b> Inhibition of cell migration by EECf (12.5, 25 and 50 mg/kg, p.o.) in thioglycollate-induced peritonitis. Results are expressed as mean±SD for each experimental group (n=7). Significant after analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test with confidence interval of 95% compared to the control group. *p<0.05 compared to control.	<b>101</b>
<b>Figure 2.</b> Effect of EECf in the ear edema induced by xylene. Results are expressed as mean±SD for each experimental group (n=7). Significant after analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test with confidence interval of 95% compared to the control group. *p<0.05 compared to control group.	<b>102</b>
<b>Figure 3.</b> Effect of EECf in the vascular permeability induced by acetic acid measured as Evans blue dye extravasation in swiss albino mice males (n=7). Significant after analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test with confidence interval of 95%	<b>102</b>

compared to the control group. \*p<0.05 compared to control.

**Figure 4.** Response observed in the writhing test induced by acetic acid with EECf in the doses of 12.5, 25 and 50 mg/kg in swiss albino mice (*Mus musculus*) males (n=7). Results are expressed as mean±SD for each experimental group. Significant after analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test with confidence interval of 95% compared to the control group. \*p<0.05 compared to control group. **102**

## **APÊNDICE B - CAPÍTULO II**

**Figure 1:** Effects of MTX (methotrexate), CE, and F80 on the growth of sarcoma 180 in Swiss albino male mice. Each column represents the mean of six animals, and vertical lines show the SEM. The asterisk denotes the significance level in comparison to the control value: \*P < 0.05. **110**

**Figure 2:** Effect of pretreatment with dexamethasone, piroxicam, indomethacin (standard drugs), CE, and F80 on migration of polymorphonuclear leukocytes (PMNLs) (number of PMNLs/mL exudate) in carrageenan-induced peritonitis in mice. Each column represents the mean of six animals, and vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance level in comparison to the control value: \*P < 0.05. **110**

**Figure 3:** Inhibitory effects of the standard drugs, dexamethasone and piroxicam, CE, and F80 in relation to the control group for NO production. Each column represents the mean of six animals, and vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance level in comparison to the control value: \*P < 0.05. **111**

**Figure 4:** Effects of the standard drugs, piroxicam and dipyron, CE, and F80 in relation to the control group on writhing induced in mice by intraperitoneal injection of acetic acid. Each column represents the mean of six animals, and vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance level in comparison to the control value: \*P < 0.05. **112**

## **APÊNDICE C - CAPÍTULO III**

**Figure 1** – Artemicidal activity of CfePL (a), CfeBL (b) and CfeLL (c) at different concentrations. Vertical lines show the S.E.M. and asterisks denote the significance level in comparison to the control value: \*P < 0.05. **121**

**Figure 2** – Embryotoxic activity of CfePL (a) and CfeLL (b) at different concentrations against *B. glabrata*. Vertical lines show the S.E.M. and asterisks denote the significance level in comparison to the control value: \*P < 0.05. **123**

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
<b>Tabela 1</b> – Atividade moluscicida de espécies vegetais.	<b>44</b>
<b>Tabela 2</b> – Algumas drogas citotóxicas derivadas de fontes vegetais.	<b>52</b>
<b>ARTIGOS</b>	
<b>APÊNDICE A - CAPÍTULO I</b>	
<b>Table 1.</b> Effect of EECf in the nociception induced by formalin.	<b>102</b>
<b>APÊNDICE B - CAPÍTULO II</b>	
<b>Table 1:</b> Evaluation of anti-inflammatory activity of standard drugs (dexamethasone, piroxicam and indomethacin), CE, and F80 on carrageenan-induced peritonitis in pretreated mice.	<b>110</b>
<b>Table 2:</b> Antinociceptive effect of standard drugs (piroxicam and dipyrone), CE, and F80 on acetic acid-induced writhing response test in mice.	<b>111</b>
<b>APÊNDICE C - CAPÍTULO III</b>	
<b>Table 1</b> – Artemicidal activity of CfePL, CfeBL and CfeLL.	<b>122</b>
<b>Table 2</b> – Molluscicidal activity of CfePL, CfeBL and CfeLL against <i>B. glabrata</i> embryos.	<b>124</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

**AAL:** lectina de *Agrocybe aegerita*

**AAS:** ácido acetilsalicílico

**a.C.:** antes de Cristo

**AH:** atividade hemaglutinante

**AHL:** lectina de *Arisaema helleborifolium*

**AINE:** Drogas anti-inflamatórias não esteroidais

**AMML:** lectina de *Astragalus mongholicus* Bunge [*A. membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge)]

**ANOVA:** Análise de variância simples (do inglês *one-way analysis of variance*)

**A-549:** linhagem celular de câncer de pulmão humano

**BGC-823:** linhagem celular de câncer gástrico humano

**BIL:** lectina de *Bothropus leucurus*

**BmoLL:** lectina da folha de *Bauhinia monandra*

**CEEA-UFPE:** Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE

**CcL:** lectina obtida de *Caulerpa cupressoides*

**CE:** extrato bruto (do inglês *crude extract*)

**CFAL:** lectina de *Clitoria fairchildiana*

**CfeBL:** lectina da entrecasca de *Caesalpinia ferrea* (do inglês *Caesalpinia ferrea bark lectin*)

**CfeLL:** lectina da folha de *Caesalpinia ferrea* (do inglês *Caesalpinia ferrea leaf lectin*)

**CfePL:** lectina da vagem de *Caesalpinia ferrea* (do inglês *Caesalpinia ferrea pod lectin*)

**CfL:** lectina de *Cratylia floribunda*

**CNPq:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**COBEA:** Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Brazilian College of Animal Experimentation)

**Con A:** Concanavalina A (lectina obtida de *Canavalia ensiformis*)

**ConBr:** lectina obtida de sementes de *Canavalia brasiliensis*

**COX:** ciclo-oxigenase

**CO<sub>2</sub>:** gás carbônico

**Cra:** lectina de *Cratylia mollis* encapsulada em lipossomas

**Cramoll:** lectina de *Cratylia mollis*

**CrataBL:** lectina da entrecasca de *Crataeva tapia* (*Crataeva tapia* bark lectin)

**DguiL:** lectina de *Dioclea guianensis*

**DMBA:** 7,12-dimetilbenzantraceno

**DMEM:** Minimum Essential Medium Eagle Modified Dulbecco's

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DNA:** ácido desoxirribonucléico

**DrL:** lectina de *Dioclea rostrata*

**DvL:** lectina de *Dioclea violacea*

**DvioL:** lectina de *Dioclea violacea*

**EAC:** carcinoma ascítico de Erlich

**ECM:** matriz extracelular

**ECorl:** lectina de *Erythrina coralladendron*

**EDTA:** ácido etilenodiamino tetra-acético

**EECF:** extrato etanólico dos frutos de *Caesalpinia ferrea*

**F80:** fração 0-80%

**GHS:** Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (do inglês *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*)

**HA:** atividade hemaglutinante (do inglês *haemagglutinating activity*)

**HCT-15:** linhagem celular de câncer de cólon humano

**HCT-29:** linhagem celular de câncer de cólon humano

**HeLa:** linhagem celular de carcinoma cervical humano

**HEp-2:** células derivadas de tumor primário da laringe humana

**HEP-2:** linhagem celular de câncer de fígado humano

**HGA:** Lectina de *Holothuria grisea* (*Holothuria grisea* agglutinin)

**HL-60:** linhagem celular de leucemia promielocítica humana

**HOP-62:** linhagem celular de câncer de pulmão humano

**IASP:** Associação Internacional do estudo da dor

**IC<sub>50</sub>:** concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle

**IF:** fator de impacto (do inglês *impact factor*)

**IL:** interleucina

**INCA:** Instituto Nacional do Câncer

**iNOS:** óxido nítrico sintase induzível

**LC<sub>50</sub>:** concentração letal média

**LD<sub>50</sub>:** dose letal aguda para 50% dos animais

**LT:** leucotrieno

**MCL:** lectina de *Momordica charantia*

**MGC80-3:** linhagem celular de câncer gástrico humano

**MLL:** lectina obtida das folhas de *Morus alba*

**MMP:** metaloproteinases da matriz extracelular

**MTT:** brometo-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio

**MTX:** metotrexato

**NaCl:** cloreto de sódio

**NaNO<sub>2</sub>:** nitrito de sódio

**NCI:** Instituto Nacional do Câncer (do inglês *National Cancer Institute*)

**NCI-H292:** células mucoepitelióides obtidas a partir de carcinoma de pulmão humano

**NO:** óxido nítrico

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** nitrito

**NPC:** carcinoma nasofaríngeo humano (do inglês *human nasopharyngeal carcinoma*)

**NSAID:** Drogas anti-inflamatórias não esteroidais (do inglês *non-steroidal anti-inflammatory drugs*)

**OD:** densidade óptica (do inglês *optical density*)

**OECD:** Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês *Organization for Economic Cooperation and Development*)

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PAF:** Fator de ativação das plaquetas

**PBS:** tampão fosfato de sódio

**PC-3:** linhagem celular de câncer de próstata humano

**PG:** prostaglandina

**pH:** potencial hidrogeniônico

**PHA:** fitohemaglutinina (lectina obtida de *Phaseolus vulgaris*)

**PMNL:** leucócito polimorfonuclear (do inglês *polymorphonuclear leukocyte*)

**PPAR:** receptor ativado por proliferador de peroxissomo (do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor*)

**ppm:** partes por milhão

**ppt:** partes por trilhão

**RIP:** Proteína inativadora de ribossomo (do inglês, *ribosome-inactivating protein*)

**SAID:** Drogas anti-inflamatórias esteroidais (do inglês *steroidal anti-inflammatory drugs*)

**SejaBL:** lectina de *Sebastiania jacobinensis*

**S.E.M.:** erro padrão médio (do inglês *standard error medium*)

**SGC-7901:** linhagem celular de câncer de estômago humano

**SHA:** atividade hemaglutinante específica (do inglês *specific haemagglutinating activity*)

**SLL-1:** lectina obtida de sementes de *Moringa oleifera*

**SLL-2:** lectina obtida de sementes de *Moringa oleifera*

**SLL-3:** lectina obtida de sementes de *Moringa oleifera*

**SNC:** sistema nervoso central

**SNP:** sistema nervoso periférico

**SW480:** linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano

**TCSL:** lectina da semente de *Trichosanthes cucumerina* (do inglês *Trichosanthes cucumerina* seed lectin)

**TGF- $\beta$ :** fator transformante do crescimento  $\beta$

**TGL:** lectina de *Tulipa gesneriana* L. (do inglês *Tulipa gesneriana* lectin)

**Th1:** célula T helper 1

**TNF:** fator de necrose tumoral (do inglês *tumour necrosis factor*)

**TPA:** 12-O-tetra-decanoilforbol-13-acetato

**TRPV1:** receptor de potencial transiente vaniloide-1 (do inglês *transient receptor potential vanilloid 1*)

**TX:** tromboxano

**VAC1:** lectina de *Viscum album*

**VAC2:** lectina de *Viscum album*

**WHO:** Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

**WSMoL:** lectina solúvel em água obtida de sementes de *Moringa oleifera*

**5-HT:** 5-hidroxitriptamina

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
2.1 GERAL	22
2.2 ESPECÍFICOS	22
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>23</b>
3.1 PLANTAS MEDICINAIS	23
3.1.1 Preparações lectínicas em plantas medicinais	24
3.2 LECTINAS	26
3.2.1 Conceito e generalidades	26
3.2.2 Classificação e tipos de ligação lectina-açúcar	27
3.2.3 Especificidade e Atividade Hemaglutinante (AH)	28
3.2.4 Obtenção de preparações lectínicas	29
3.2.5 Caracterização de preparações lectínicas	34
3.2.6 Lectinas de plantas	35
3.2.7 Aplicações biotecnológicas de preparações lectínicas	37
3.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE	37
3.3.1 <i>Artemia salina</i>	38
3.3.2 <i>Biomphalaria glabrata</i> e a esquistossomose mansônica	40
3.3.2.1 Agentes moluscicidas	43
3.4 CÂNCER	46
3.4.1 Conceito e generalidades	46
3.4.2 Metástase	49
3.4.3 Tratamento do câncer	51
3.5 INFLAMAÇÃO	52
3.5.1 Inflamação aguda	53
3.5.2 Mediadores inflamatórios	55
3.5.3 Inflamação crônica	57
3.5.4 Tratamento da inflamação	58
3.5.5 Relação inflamação x câncer	59
3.6 DOR	60
3.6.1 Os principais tipos de dor	62

<b>3.6.2</b>	<b>Nociceção e a condução do estímulo doloroso</b>	<b>62</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Tratamento da dor</b>	<b>63</b>
<b>3.7</b>	<b><i>Libidibia (Caesalpinia) ferrea</i> var. <i>parvifolia</i> (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz</b>	<b>65</b>
<b>3.7.1</b>	<b>Descrição botânica e importância econômica da espécie</b>	<b>65</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Propriedades terapêuticas</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>69</b>
<b>4</b>	<b>APÊNDICE A - CAPÍTULO I</b>	<b>98</b>
<b>5</b>	<b>APÊNDICE B - CAPÍTULO II</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>APÊNDICE C - CAPÍTULO III</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>131</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>132</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos a humanidade utiliza plantas com finalidade terapêutica. Enquanto buscava alimentação para sua sobrevivência, o homem foi descobrindo propriedades tóxicas ou curativas nos vegetais. Esse conhecimento etnofarmacológico acumulado ao longo de nossa evolução culminou com o desenvolvimento de fármacos de grande importância na terapêutica atual.

As plantas medicinais são aquelas que agem no tratamento de doenças ou ajudam a melhorar a condição da saúde das pessoas e podem ser estudadas na forma de extratos (aquosos, etanólicos ou em outros solventes orgânicos) a fim de se investigar suas atividades biológicas, seja de todos os compostos presentes ou com intuito de se isolar e identificar seus princípios ativos. Uma vez provada sua eficácia podem dar origem a fitoterápicos, que são os produtos que possuem princípios ativos medicinais de plantas.

A maioria dos compostos presentes nas plantas faz parte do metabolismo primário (aminoácidos, proteínas, lipídeos e carboidratos). Além desses metabólitos primários, as plantas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários (alcaloides, terpenoides, antocianinas, esteroides, flavonoides, quinonas e ligninas), os quais embora estejam presentes em concentrações bem menores, têm encontrado aplicações comerciais como fármacos, corantes, aromas, inseticidas etc. Esses compostos apresentam uma ampla diversidade em estruturas e complexidade, sendo encontrados e distribuídos por todo o reino vegetal. Contudo, dentre os metabólitos primários estão as lectinas, as quais estão sendo extensivamente investigadas quanto às suas potencialidades biotecnológicas. Estas podem ser isoladas de extratos através de técnicas de purificação comumente utilizadas na obtenção de proteínas.

Neste trabalho, são abordados três temas centrais de grande importância na área da saúde: o câncer, a inflamação e a dor. O câncer representa um problema de saúde pública a nível global, muitas vezes associado a quadros inflamatórios e geralmente acompanhado de dores insuportáveis que incapacitam o paciente. Ao longo dos anos, muita atenção tem sido dada à busca de drogas de origem natural que combatam essas e outras doenças, baseando-se no conhecimento popular e acreditando-se que estas possam ser mais eficazes e trazer menos efeitos colaterais, quando comparadas com as sintéticas.

A planta fonte dos compostos testados no presente trabalho trata-se de uma árvore bastante utilizada na medicina popular brasileira, conhecida como pau-ferro ou jucá. Pode-se



dizer que desta planta tudo se aproveita, da raiz aos frutos, tanto para fornecimento de lenha quanto para alimentação animal, além das inúmeras aplicações medicinais.

A obtenção de extratos e a purificação de três lectinas a partir das folhas, vagens e entrecasca do pau-ferro promoveram a necessidade de investigá-las quanto à sua toxicidade, bem como quanto às suas potencialidades biotecnológicas frente a culturas de células cancerosas, um tumor experimental e testá-los em modelos de inflamação e nocicepção, relacionados às principais aplicações desta planta na medicina popular. Contudo, para que estes compostos vegetais tornem-se fármacos ou agentes pesticidas, vários ensaios devem ser realizados a fim de caracterizá-los quimicamente e de se avaliar a eficiência e toxicidade dos mesmos, embasando cientificamente suas propriedades e efeitos. Nos testes de letalidade, são comumente utilizados organismos simples, como a *Artemia salina*, ou ainda, embriões do molusco *Biomphalaria glabrata* no ensaio de embriotoxicidade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- Avaliar preparações hidroalcoólicas obtidas de *L. ferrea* var. *parvifolia*, visando empregá-las como fitofármacos ou agentes de controle biológico.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Obter o extrato etanólico (EECf) das vagens de *L. ferrea* var. *parvifolia*;
- Obter os extratos aquosos a partir de folhas, vagens e entrecasca;
- Obter frações proteicas (F80) parcialmente purificadas por precipitação com sulfato de amônio a partir das vagens e entrecasca;
- Determinar a LD<sub>50</sub> (dose letal aguda para 50% dos animais) do extrato bruto aquoso (CE) e da fração (F80) obtidos da vagem;
- Avaliar as atividades citotóxica e antitumoral de CE e F80 obtidos da vagem;
- Avaliar as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva dos extratos etanólico e aquoso e da fração obtidos da vagem;
- Purificar as lectinas CfePL, CfeBL e CfeLL a partir dos extratos das vagens, entrecasca e folhas, respectivamente;
- Avaliar atividades artemicida e embriotóxica de CfePL, CfeBL e CfeLL.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas constituem uma importante fonte de produtos naturais ativos que diferem amplamente em termos de estrutura e propriedades biológicas. Elas desempenham um papel notável na medicina tradicional em muitos países, e fármacos à base de plantas têm sido usadas em todo o mundo para o tratamento de várias doenças (ARGOLO et al., 2004; BALUNAS; KINGHORN, 2005; GAUTAM; SAKLANI; JACHAK, 2007; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; LICCIARDI; UNDERWOOD, 2011). Além das suas propriedades farmacêuticas, as plantas medicinais são úteis também para o controle de pragas e melhoria do solo (KHANH et al., 2005).

Ao longo dos anos, decocções e misturas de ervas medicinais utilizadas na dieta, bem como fitoquímicos, mostraram uma série de propriedades terapêuticas, embora suas características químicas e mecanismos de ação ainda não sejam adequadamente compreendidos. Assim, o uso destas plantas medicinais, de forma combinada ou isolada, como drogas anti-inflamatórias e analgésicas na medicina popular, por exemplo, é uma prática comum que proporciona um alívio de sintomas comparável àquele obtido com medicamentos alopáticos, embora na maioria das vezes os princípios ativos das plantas sejam desconhecidos (ABAD et al., 1996; AWAH et al., 2012; JAVAN et al., 1997).

O uso de extratos de plantas medicinais tem sido praticado há muitos séculos por uma proporção significativa da população do Brasil, particularmente por habitantes do interior do país, com o intuito de obter os cuidados essenciais referentes à saúde física e psicológica (LIMA et al., 2006; MEDEIROS; ALBUQUERQUE, 2012; NAPOLITANO et al., 2005). Recentemente, a aceitação da medicina tradicional como uma forma alternativa de cuidados de saúde aumentou entre todos os grupos sócio-econômicos da população, e a fitomedicina tornou-se um setor econômico importante no Brasil, impulsionando estudos relacionados às atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral e citotóxica de espécies vegetais (HOLETZ et al., 2002; LIMA et al., 2006; SANTOS PIMENTA et al., 2003; SUYENAGA et al., 2002).

Assim, muitas espécies de plantas estão sendo utilizadas atualmente sob a forma de extratos brutos, infusões ou cataplasmas, a fim de tratar infecções comuns, mas na ausência de qualquer evidência científica sobre sua eficácia. Por estas razões, as plantas medicinais se tornaram o foco de intensos estudos em termos de validação de seus usos tradicionais por

meio da determinação dos seus verdadeiros efeitos farmacológicos, e em termos de conservação dessas espécies que são obtidas a partir de populações selvagens e cuja existência é ameaçada pela colheita indiscriminada (LIMA et al., 2006).

Em um nível global, Brooker; Bethony; Hotez (2004) recomendaram que os governos nacionais incentivassem mais pesquisas sobre plantas medicinais tradicionais. De fato, a Organização Mundial da Saúde (OMS) já incentiva o desenvolvimento de estratégias regionais de medicina tradicional para realizar investigação sobre plantas medicinais e promover a otimização da sua utilização no sistema de saúde, já que nos países pobres, a saúde muitas vezes é sustentada por outras práticas baseadas em alternativas culturais (ABROGOUA et al., 2012; ADEBAYO; KRETTLI, 2011).

É razoável considerar que um levantamento de usos etnomédicos de uma planta possa fornecer pistas úteis para a descoberta de drogas. Um número significativo de fármacos à base de ervas tem sido avaliado clinicamente e estes são utilizados nos dias de hoje até mesmo nos países desenvolvidos como uma alternativa da medicina tradicional. Logo, a etnofarmacologia pode servir como a primeira evidência da eficácia terapêutica de plantas que podem levar à descoberta de medicamentos capazes de competir com a medicina sintética convencional (DEY; DE, 2012; HOUGHTON, 2001; LANSKY et al., 2008).

Mesmo com todos os desafios, a descoberta de medicamentos a partir de plantas medicinais permanecerá como componente essencial na busca de novos medicamentos (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

### **3.1.1 Preparações lectínicas em plantas medicinais**

Em décadas recentes, o interesse em produtos naturais derivados de plantas tem crescido rapidamente (GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011). A pesquisa atual na descoberta de medicamentos a partir de plantas medicinais envolve uma abordagem multifacetada combinando técnicas botânicas, fitoquímicas, biológicas e moleculares. A descoberta de drogas advindas destas fontes continua a fornecer novas e importantes pistas relacionadas a diversos alvos farmacológicos, incluindo câncer, HIV/AIDS, mal de Alzheimer, malária e dor. Inclusive várias destas drogas têm sido recentemente introduzidas no mercado americano, como a galantamina, a nitisinona e o tiotrópio, ou estão atualmente envolvidos em fase final de ensaios clínicos (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dada aos efeitos farmacológicos dos peptídeos naturais e proteínas, entre eles as lectinas (GAIDAMASHVILI; VAN STADEN,

2006). Logo, preparações obtidas de várias plantas medicinais, apresentando lectinas bioativas, têm sido extensivamente testadas quanto à sua potencialidade biotecnológica.

*Moringa oleifera*, uma importante espécie vastamente utilizada devido a sua composição nutricional e propriedades medicinais (ANWAR et al., 2007; GHASI; NWOBODO; OFILI, 2000), também tem sido alvo de pesquisas relacionadas a preparações lectínicas. Segundo Coelho et al. (2009), trabalhando com diferentes extratos aquosos obtidos das sementes desta espécie, a presença de atividade hemaglutinante sugere que a lectina solúvel WSMoL presente nestes extratos promove o atraso do desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti* e também sua mortalidade. Além disso, a ausência de atividade larvicida em WSMoL desnaturada pelo calor reforça o envolvimento desta lectina neste tipo de atividade.

Preparações lectínicas de plantas medicinais oriundas da África do Sul já foram testadas quanto à interação com os patógenos bacterianos Gram-positivos *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e quanto à inibição da síntese de prostaglandinas. Foram observadas, então, reações de agregação seletivas com as linhagens de bactérias e inibição da ciclooxigenase 1, sugerindo a possibilidade de emprego destas aglutininas em microbiologia clínica e o aproveitamento de suas propriedades anti-inflamatórias (GAIDAMASHVILI; VAN STADEN, 2002; GAIDAMASHVILI; VAN STADEN, 2006).

A lectina isolada a partir do extrato bruto do cerne de *Myracrodruon urundeuva* apresentou atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante. Este peptídeo bioativo demonstrou uma proteção química, a qual é evidente na durabilidade do cerne desta espécie. A lectina também demonstrou sua ação como um inseticida eficaz contra a atividade de cupins, como um agente larvicida contra os transmissores da febre amarela e dengue (*Aedes aegypti*) (SÁ et al., 2009a, b, c). Esta espécie parece ser efetiva, ainda, para os muitos usos mencionados pela comunidade, incluindo: ação contra dores de dente e de cabeça, apresentando efeito analgésico comprovado; como um antisséptico devido à atividade antibacteriana e antifúngica, e para inflamações genitais, ovarianas, ou de órgãos internos em geral (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010).

*Morus alba* é uma planta medicinal importante da qual vários compostos farmacologicamente importantes já foram isolados a partir de diversas partes. Entre estes, a lectina MLL, obtida das suas folhas, demonstrou efeito anti-proliferativo frente a linhagens celulares de câncer de mama e de cólon humanos (DEEPA et al., 2012).

## 3.2 LECTINAS

### 3.2.1 Conceito e generalidades

As lectinas são um grupo heterogêneo de proteínas ou glicoproteínas que se ligam de forma específica e reversível a carboidratos ou glicoconjugados através de pelo menos um domínio não-catalítico, além de apresentarem origem não-imune (CORREIA et al., 2008; KENNEDY et al., 1995; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; SHARON, 2007; WU et al., 2009). Variam em tamanho, estrutura, organização molecular, assim como nos seus sítios de ligação a carboidratos; e são amplamente distribuídas na natureza (GERLACH et al., 2005). Já foram identificadas lectinas nos mais diversos seres vivos, como animais (ALPUCHE et al., 2005; ANTUNES; COELHO, 1993; DUNPHY et al., 2002; HAIJIE et al., 2007; TAKAHASHI; KURODA; MUROGA, 2008; WANG; GAO; NG, 2000), plantas – principalmente em sementes e entrecascas (BRANCO et al., 2004; COELHO; SILVA, 2000; QIAOJUAN et al., 2005; SOL; CAVADA; CALVETE, 2007), microrganismos (KAWAGISHI et al., 2001; LEONIDAS et al., 2007; SULAGNA et al., 2004) e fungos (FENG et al., 2006). Podem, ainda, ser produzidas por técnicas recombinantes (LAM; NG, 2011).

A primeira descoberta de uma lectina data do final do século XIX, quando Peter Hermann Stillmark estudava a toxicidade do extrato de sementes de mamona (*Ricinus communis*) e encontrou uma proteína, que foi chamada ricina (VAN DAMME et al., 2008). Como a ricina mostrou a capacidade de aglutinar eritrócitos, o termo hemaglutinina foi introduzido. Mais tarde, foi reconhecido que algumas hemaglutininas podiam aglutinar eritrócitos humanos seletivamente em função de seu tipo sanguíneo do grupo ABO. Esta descoberta deu origem à palavra “lectina” que é derivada de “*legere*”, o verbo em latim para “selecionar” (HARTMUT, 1988; KENNEDY et al., 1995; VAN DAMME et al., 2008). Porém este termo só foi introduzido por Boyd e Shapleigh em 1954 (BOYD; SHAPLEIGH, 1954; HONG et al., 2001).

Desde então, várias outras lectinas foram descobertas. Em 1889, H. Hellin descobriu outra hemaglutinina, a abrina, presente no extrato tóxico de sementes de *Abrus precatorius* (jequiriti) (DÍAZ et al., 1999; SHARON; LIS, 1972). Alguns anos depois, James B. Summer isolou da semente de *Canavalia ensiformis* a primeira lectina obtida na forma cristalina, denominada Concanavalina A (Con A) (SHARON; LIS, 2004). O estudo sobre estas proteínas, portanto, abriu uma vasta área de aplicação para as lectinas (GABOR et al., 2001).

### 3.2.2 Classificação e tipos de ligação lectina-açúcar

Tomando-se como base sua natureza estrutural, as lectinas têm sido subdivididas em quatro classes distintas: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

As **merolectinas** são aquelas que apresentam apenas um domínio de ligação a carboidratos, são pequenas e devido à sua natureza monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células, como por exemplo, as proteínas monoméricas ligadoras de manose e a proteína obtida do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), a heveína, que se liga à quitina. As **hololectinas** – grupo no qual a maioria das lectinas vegetais conhecidas está inserida, comportando-se como hemaglutininas – apresentam dois ou mais domínios de ligação homólogos (idênticos ou muito similares) para carboidratos ou derivados, e, devido à sua natureza di- ou multivalente são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. Já as **quimerolectinas** são proteínas que possuem um ou mais domínios de ligação com especificidade para diferentes moléculas de carboidrato (GRUBHOFFER; HYPISA; VOLF, 1997; PEEL; BULMER, 1996) e um outro domínio não relacionado que funciona independentemente daquele de ligação para carboidratos e que pode apresentar atividade enzimática bem definida ou outra atividade biológica. Exemplos típicos de quimerolectinas são quitinases classe I, com um sítio de ligação a carboidrato e um sítio catalítico; e RIPs tipo II, apresentando dois sítios de ligação a carboidrato e um sítio de inativação ribossômica (PEUMANS et al., 2001; VAN DAMME et al., 1996).

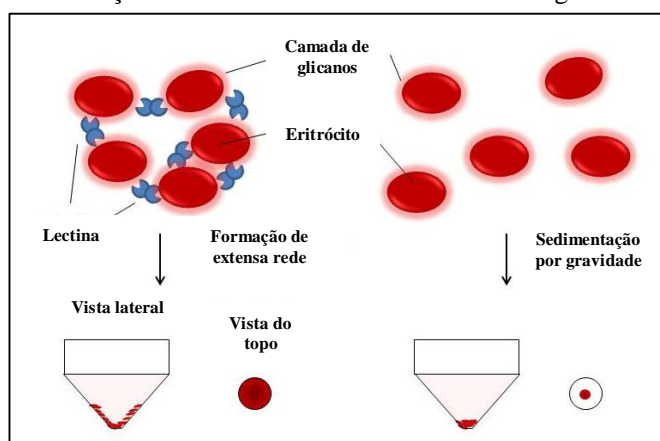
Por fim, as **superlectinas** são proteínas que apresentam pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos estruturalmente diferentes, reconhecendo dois carboidratos diferentes. Este pode ser considerado um grupo especial das quimerolectinas consistindo de dois domínios estruturalmente e funcionalmente diferentes de ligação a carboidratos (VAN DAMME et al., 1996). A lectina TGL do bulbo de *Tulipa gesneriana L.* com dois sítios, um específico para manose e o outro específico para N-acetilgalactosamina, é um exemplo de superlectina (PEUMANS et al., 2001; PEUMANS; VAN DAMME, 1998; VAN DAMME et al., 1996).

A interação e a seletividade da ligação entre carboidratos e lectinas, através de seus sítios de ligação que tendem a se localizar na superfície da molécula proteica, dá-se através de ligações fracas, como pontes de hidrogênio, coordenação metálica, interações de van der Waals e hidrofóbicas, que ocorrem entre o carboidrato e a proteína (COMINETTI et al., 2002; ELGAVISH; SHAANAN, 1997; SHARON; LIS, 2002).

### 3.2.3 Especificidade e Atividade Hemaglutinante (AH)

Pelo fato das lectinas aglutinarem eritrócitos de diferentes espécies animais (CORREIA; COELHO, 1995; PAIVA; COELHO, 1992; REYNOSO-CAMACHO; DE MEJIA; LOARCA-PINA, 2003), sua presença em uma amostra pode ser facilmente detectada a partir do ensaio de hemaglutinação. Neste, uma diluição seriada da amostra é efetuada, antes da incubação com os eritrócitos humanos ou de outros animais, química ou enzimaticamente tratados a fim de aumentar-se a sensibilidade das células à lectina (BANERJEE et al., 2004; BRANCO et al., 2004; COELHO; SILVA, 2000; GAIDAMASHVILI; VAN STANDEN, 2002). Nesta situação, há a formação de uma rede ou malha decorrente da interação entre a lectina e os carboidratos presentes na membrana dos eritrócitos através de seus sítios de ligação, formando diversas ligações reversíveis entre células opostas, promovendo tal hemaglutinação (**Figura 1**) (NAEEM et al., 2007; SANTOS et al., 2005). Contudo, somente a aglutinação de eritrócitos não é suficiente para comprovar a presença de lectina, pois alguns agentes, como os taninos, certos lipídeos ou cátions divalentes em altas concentrações também podem apresentar esta atividade (RUDIGER, 1998). Logo, para garantir que o agente aglutinante trata-se de uma lectina, são necessários ensaios subsequentes de inibição da atividade hemaglutinante (AH) utilizando uma solução do carboidrato ligante (CORREIA; COELHO, 1995; KAWAGISHI et al., 2001; JAYATI; ARUN; BISHNU, 2005; SHARON; LIS, 2001).

**Figura 1** – Representação esquemática da hemaglutinação promovida por uma lectina e sua visualização através do ensaio de atividade hemaglutinante.



Modificado de: <<http://jcggdb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t123>>



A especificidade da lectina é definida em função do monossacarídeo que inibe a atividade de forma mais eficaz, e através dela as lectinas podem ser classificadas em grupos, baseados no carboidrato que demonstram mais afinidade: glicose/ manose; galactose/N-acetilgalactosamina, fucose, ácido siálico, N-acetilglicosamina e grupo glicanos complexos, quando a lectina tem especificidade por um oligossacarídeo complexo em vez de um monossacarídeo (AUDETTE; VANDONSELOAR; DELBAERE, 2000; KENNEDY et al., 1995; PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

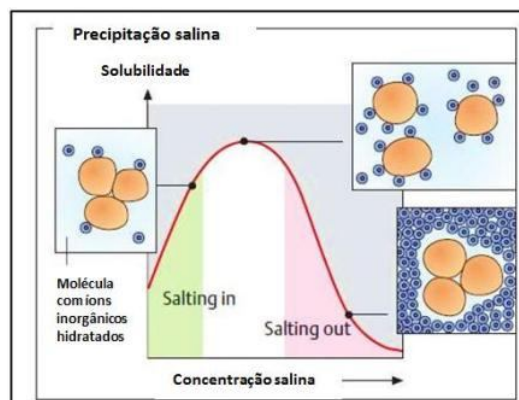
### 3.2.4 Obtenção de preparações lectínicas

Para a purificação de lectinas, são utilizados os mesmos métodos empregados para proteínas em geral, os quais se baseiam em suas características específicas, como tamanho, solubilidade e carga elétrica.

O primeiro passo é a preparação do extrato bruto, durante o qual as células são rompidas a fim de liberar suas proteínas. Tal extração ocorre sob período de tempo, agitação constante e condições de temperatura estabelecidos, e pode ser feita utilizando-se água, uma solução salina ou diferentes tampões quando é necessário controlar o pH para manutenção da atividade hemaglutinante (KAWAGISHI et al., 2001; MLADENOV et al., 2002; PAIVA et al., 2010). Submetem-se então esses extratos ao ensaio de atividade hemaglutinante, e se este apresentar resultado positivo, parte-se para o fracionamento salino (COELHO; SILVA, 2000; SÁ et al., 2008). Esta etapa baseia-se no fato de que muitas proteínas possuem uma camada de solvatação, a qual é retirada com a adição de sais, diminuindo a solubilidade da molécula e promovendo sua precipitação (**Figura 2**). O sal mais utilizado é o sulfato de amônio, em diferentes graus de saturação, pois é altamente hidrofílico e permite a precipitação proteica em soluções com elevada força iônica (DELATORRE et al., 2006; HEU; KIM; PYEUN, 1995).

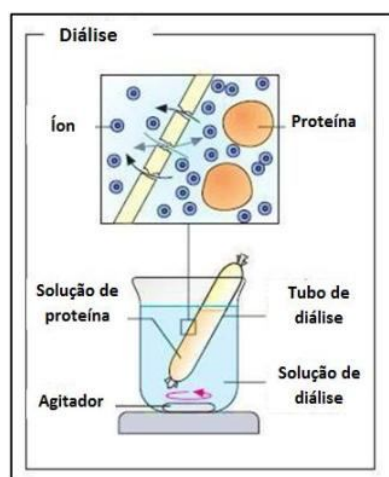
Após o fracionamento, as lectinas parcialmente purificadas são submetidas a uma diálise exaustiva em membranas semipermeáveis. Nesta fase, a separação de moléculas ocorre por diferenças de peso molecular; as proteínas ficam retidas dentro da membrana enquanto moléculas menores (como carboidratos ou sais), presentes na amostra, passam para a solução solvente (**Figura 3**) (KABIR et al., 1998; THAKUR et al., 2007). Segundo Kennedy et al. (1995), a precipitação com sulfato de amônio pode estabilizar a atividade hemaglutinante, mesmo após longos períodos de armazenamento.

**Figura 2** – Representação da precipitação salina.



Modificado de: KOOLMAN; ROEHM (2005).

**Figura 3** – Representação esquemática de uma diálise.

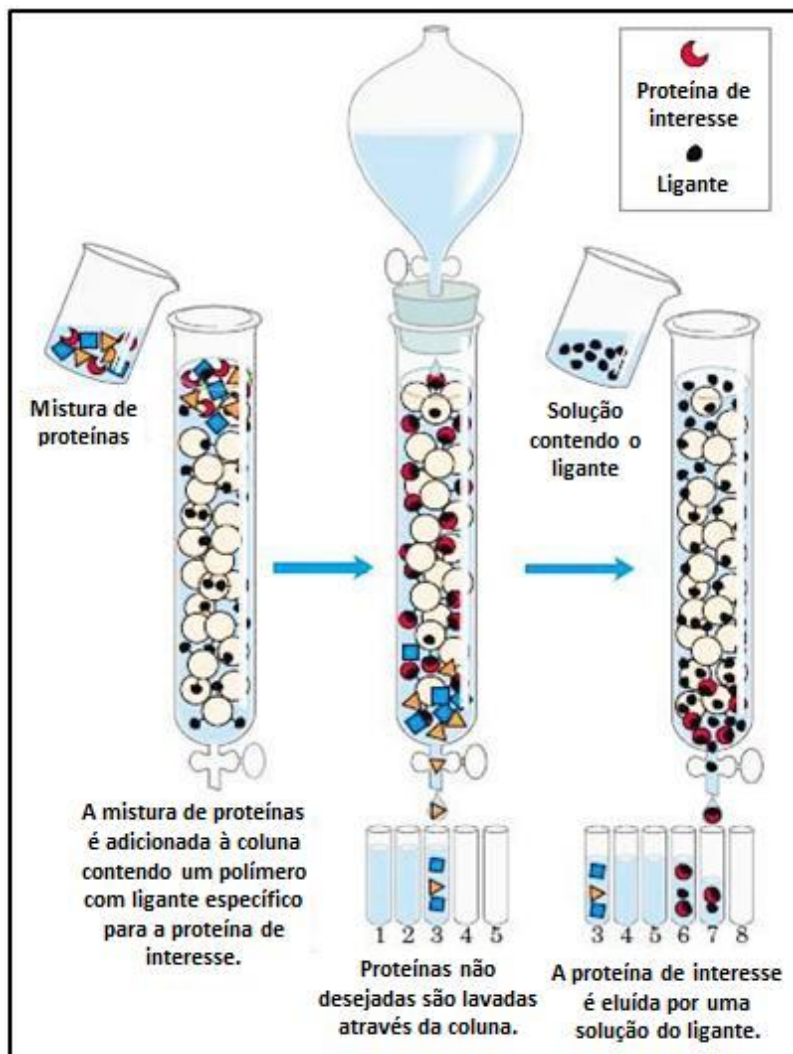


Modificado de: KOOLMAN; ROEHM (2005).

Após a extração e purificação parcial através do fracionamento salino, diversos métodos cromatográficos são usados para purificação de lectinas à homogeneidade (LAM; NG, 2011). Dentre estes se destacam: cromatografia de afinidade, a qual se baseia na especificidade a carboidratos (KEBURIA; KHURTSIDZE; GAIDAMASHVILI, 2010; SÁ et al., 2008; SOUZA et al., 2011); cromatografia de troca iônica, relacionada à carga líquida da proteína (CHEN et al., 2009; SANTI-GADELHA et al., 2006; WANG; NG, 2001; YAN et al., 2005); e cromatografia de gel filtração, também chamada de exclusão molecular, cujo princípio recai no tamanho molecular da lectina (GERLACH et al., 2005; REGO et al., 2002; ROJO et al., 2003; SILVA et al., 2009).

Na cromatografia de afinidade (**Figura 4**), há a separação das proteínas pelas suas especificidades de ligação. As proteínas retidas na coluna são aquelas que se ligam especificamente a um ligante da matriz. As proteínas que não se ligam são lavadas através da coluna, e a proteína de interesse é então eluída da coluna aplicando-se uma solução contendo o ligante livre (NELSON; COX, 2004).

**Figura 4** – Cromatografia de afinidade.

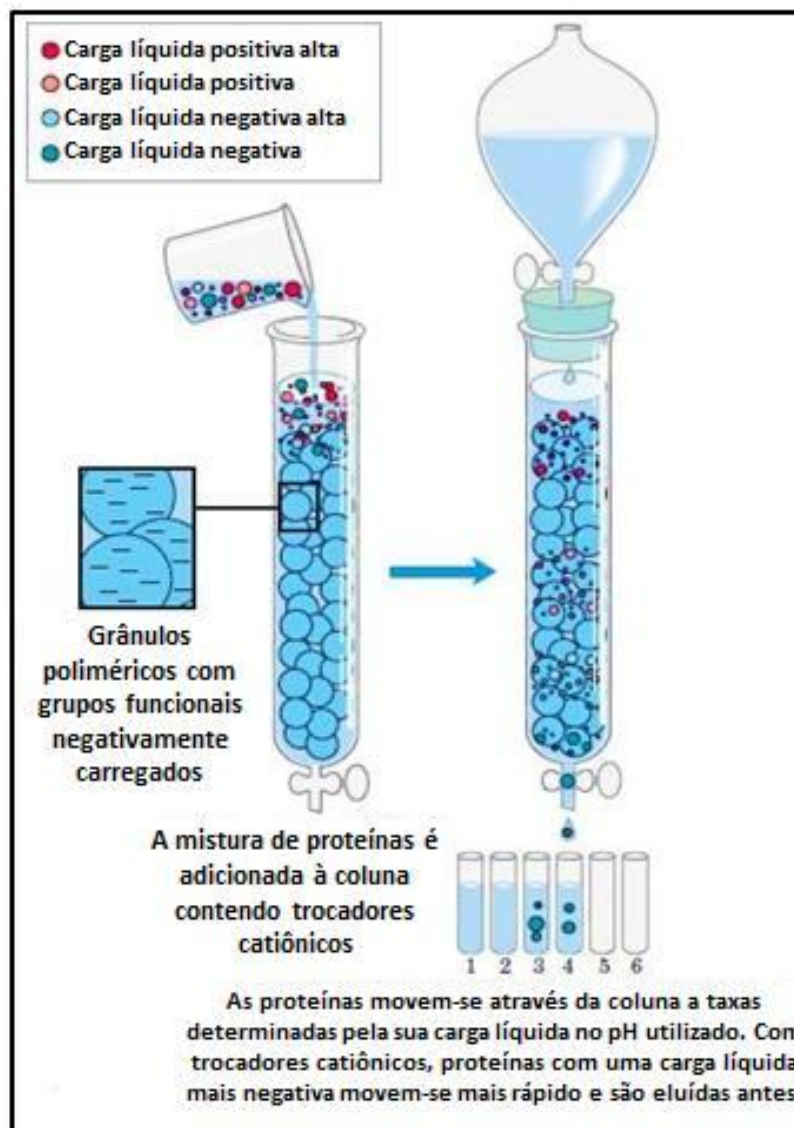


Adaptado de: NELSON; COX (2004).

A cromatografia de troca iônica (**Figura 5**) baseia-se na ligação da proteína com os grupos de cargas elétricas de sinais contrários imobilizados na matriz, em um determinado pH. A matriz da coluna é um polímero sintético contendo grupos carregados. A afinidade de cada proteína para os grupos carregados na coluna é afetada pelo pH (que determina o estado

de ionização da molécula). A coluna é lavada com solução tampão e as proteínas com nenhuma ou pouca interação com o trocador de íons (catiônico ou aniônico) são eluídas. As proteínas adsorvidas à matriz podem ser eluídas pelo aumento da força iônica ou alteração do valor do pH do meio (NELSON; COX, 2004).

**Figura 5** – Cromatografia de troca iônica.

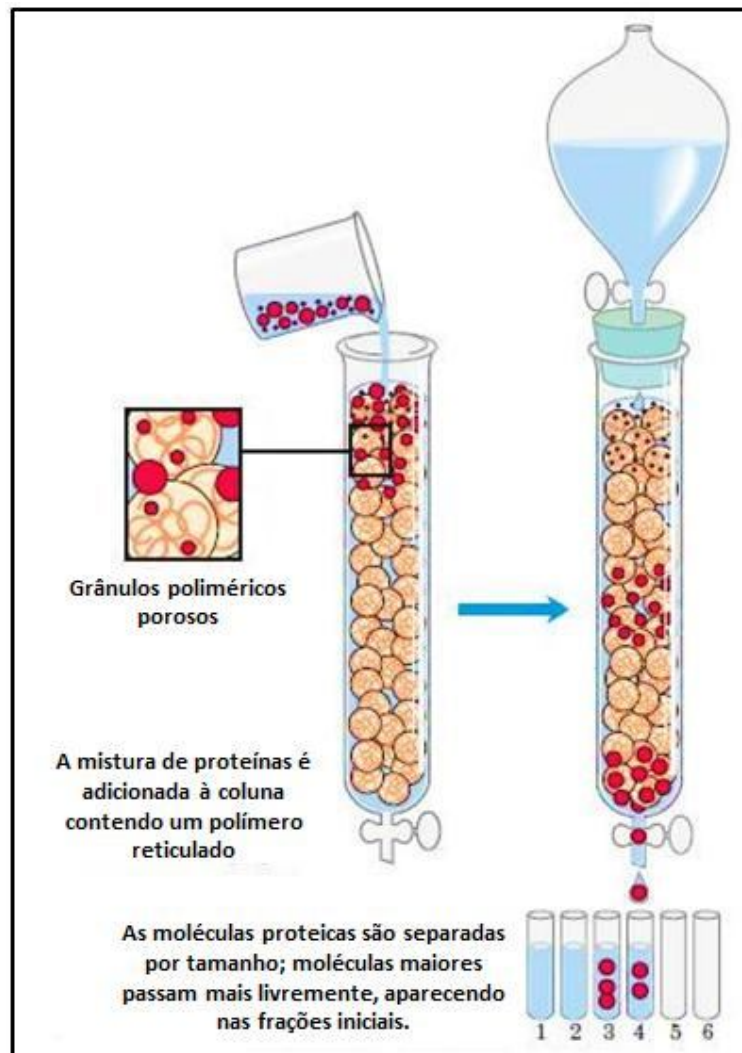


Adaptado de: NELSON; COX (2004).

A cromatografia de exclusão molecular (**Figura 6**) baseia-se na separação das proteínas de acordo com o tamanho. A matriz da coluna é um polímero com poros de tamanho selecionado. Proteínas maiores migram mais rapidamente do que as menores, porque são

grandes demais para entrar nos poros dos grânulos e, portanto, traçam uma rota mais direta através da coluna. As proteínas menores entram pelos poros e são retardadas pelo seu caminho mais labiríntico através da coluna (NELSON; COX, 2004).

**Figura 6** – Cromatografia de exclusão molecular ou gel filtração.

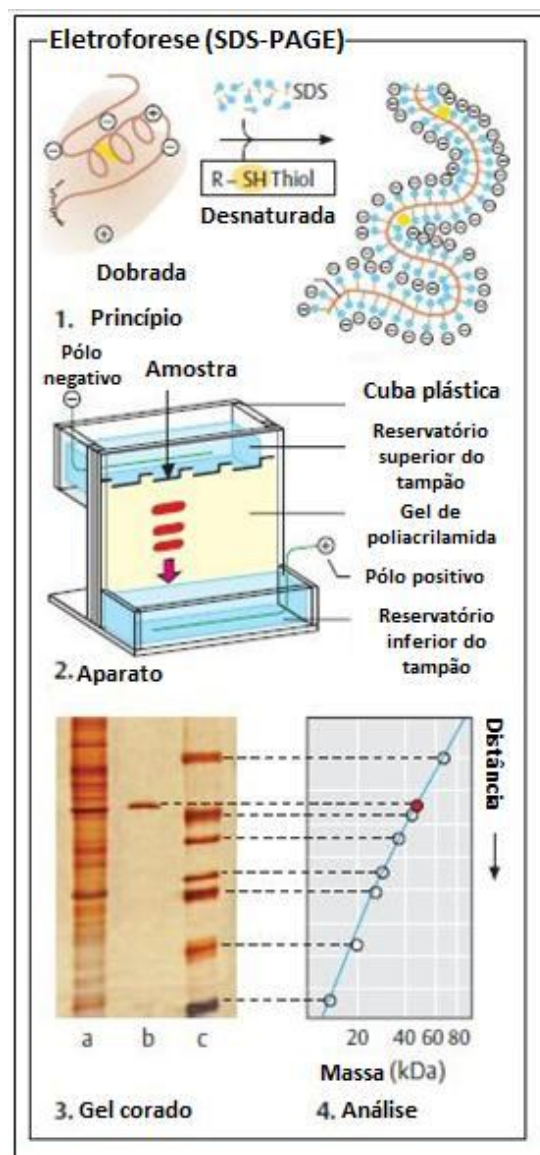


Adaptado de: NELSON; COX (2004).

### 3.2.5 Caracterização de preparações lectínicas

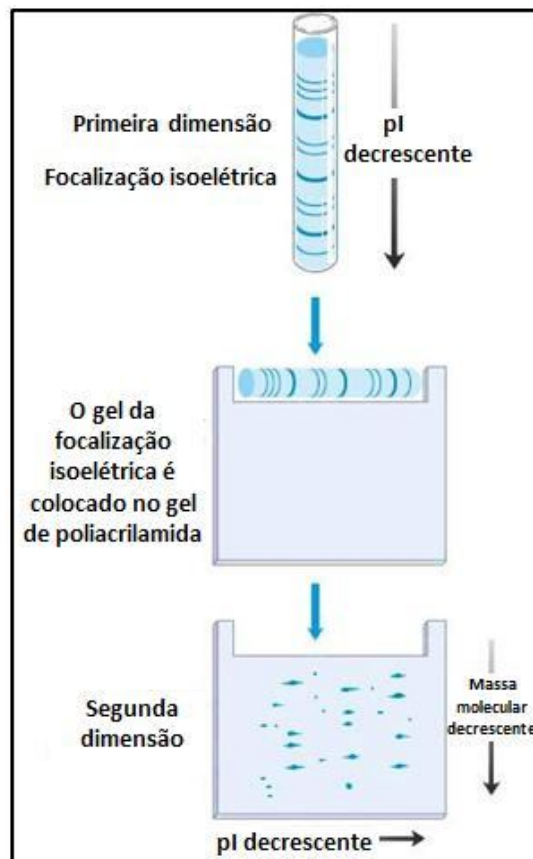
Uma vez purificadas, as lectinas podem ser caracterizadas por meio de várias técnicas, como: eletroforese (**Figura 7**), eletroforese bidimensional (**Figura 8**), determinação do ponto isoelétrico, análise da composição de aminoácido, determinação da sequência aminoacídica, estudos de fluorescência, dicroísmo circular e cristalização, entre outros (FENTON-NAVARRO et al., 2003; MARKIV et al., 2011; PEREIRA-JUNIOR et al., 2012; TRINDADE et al., 2006; VAZ et al., 2010; YAO; PAN; ZHOU, 2012).

**Figura 7** – Eletroforese (SDS-PAGE).



Adaptado de: KOOLMAN; ROEHM (2005).

**Figura 8** – Eletroforese bidimensional.



Adaptado de: NELSON; COX (2004).

### 3.2.6 Lectinas de plantas

Análises ao nível do genoma e transcriptoma têm mostrado que as sequências de lectina são ubíquas no reino vegetal e centenas de lectinas já foram purificadas a partir de várias espécies vegetais (VAN DAMME et al., 2008), sendo abundantes em raízes, frutos, flores, cascas, folhas e sementes (RATANAPO; NGAMJUNYAPORN; CHULAVATNATOL, 2001).

Diferentes funções têm sido creditadas a essas lectinas, como alongamento da parede celular, interações entre plantas e microrganismos e defesa contra o ataque de fungos, vírus, nematoides e bactérias. Esta interação entre plantas e outros organismos poder ser mediada por tais lectinas devido ao fato de que estas apresentam especificidade a carboidratos ou glicoconjugados de baixa ocorrência ou mesmo ausentes no reino vegetal (como por exemplo, galactose e ácido siálico) (HOPKINS; HARPER, 2001; LIENER; SHATON;



GOLDESTEIN, 1986; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; RIPOLL et al., 2003; RUDIGER, 1998; WONG et al., 2010).

Existe ainda uma evidência crescente de que as lectinas podem funcionar como proteínas de defesa contra insetos e outros herbívoros (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; MICHIELS; VAN DAMME; SMAGGHE, 2010; VAN DAMME, 2008; VANDENBORRE; VAN DAMME; SMAGGHE, 2009); já que, muitas vezes, as lectinas estão presentes em grandes quantidades nos órgãos de armazenamento e sementes que são particularmente vulneráveis insetos praga ou outros patógenos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Devido a estas observações, foi proposto então que as lectinas de plantas desempenhariam um papel na defesa geral contra uma variedade de invasores vegetais, além de serem usadas também como proteínas de armazenamento para o crescimento e desenvolvimento da planta (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011).

Durante as duas últimas décadas, importantes progressos têm sido atingidos no estudo da atividade de lectinas de plantas contra agentes patogênicos, nematódeos e, especialmente, os insetos praga (MA; TIAN; LI, 2010; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). Esta atividade inseticida tem sido documentada em ensaios de alimentação *in vitro* e em estudos com plantas transgênicas (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; MACEDO et al., 2002). Isto pode ser de grande potencial econômico no manejo de pragas, pois já que as lectinas são produtos do metabolismo primário, os seus genes são bons candidatos para conferir resistência a insetos em plantas transgênicas. Portanto, a purificação e caracterização das lectinas de novas fontes podem revelar genes com o potencial genético para melhoramento de culturas (KAUR et al., 2006).

As lectinas de leguminosas representam a maior e mais estudada família de proteínas desta classe. Até agora, várias destas foram isoladas e caracterizadas principalmente com base na atividade hemaglutinante, e muitas foram obtidas de sementes (DAMICO et al., 2003; KONOZY et al., 2002; KONOZY et al., 2003; LAKHTIN, 1994; LORIS et al., 1998; MACHUKA et al., 1999; SHARON; LIS, 1990; WANG; NG, 2001). Alguns exemplos bem conhecidos destas lectinas são Concanavalina A (Con A), Fitotohemaglutinina (PHA), Cramoll (obtida de *Cratylia mollis*) e a lectina de *Erythrina coralladendron* (EConl). As lectinas de leguminosas são extremamente úteis como modelo para o entendimento da base molecular de interações proteína-carboidrato por serem mais fáceis de purificar e exibirem uma grande variedade de especificidade para açúcares. Uma importante razão pelo interesse nestas lectinas é sua similaridade estrutural com as lectinas de outras fontes, como as de animais e microrganismos (SHARON; LIS, 2001).



### 3.2.7 Aplicações biotecnológicas de preparações lectínicas

As lectinas têm atraído grande interesse devido às suas várias atividades biológicas. Dentre os papéis biológicos detectáveis nas lectinas, podemos citar sua ação fungicida, antiproliferativa, antitumoral, antiviral, antimicrobiana, inseticida e aglutinação de células; além de estimular células do sistema imune (ANDRADE et al., 2004; BROEKAERT et al., 1989; DOES et al., 1999; FREIRE, 2003; SINGH; SINGH; KAMBOJ, 2004; WANG et al., 1996; WONG; NG, 2003; YE et al., 2001).

As lectinas, por terem a habilidade de combinar-se com vários glicoconjugados nas superfícies celulares e fluidos corporais, são consideradas valiosas ferramentas de investigação nos campos da genética, biomedicina, imunologia e biotecnologia, entre outros (DÍAZ et al., 1999). Além disso, as lectinas podem servir como marcadores histológicos, na observação de mudanças nos padrões de glicosilação que ocorrem na superfície celular durante os processos fisiológicos e patológicos, desde a diferenciação celular ao câncer (SHARON; LIS, 2001); e tornar-se potenciais ferramentas bioadesivas na entrega de drogas (GABOR et al., 2001).

Lectinas como AMML, DvioL, DRL e ConBr, obtidas de *Astragalus mongholicus*, *Dioclea violacea*, *D. rostrata* e *Canavalia brasiliensis*, respectivamente, possuem atividade anti-fúngica (GOMES et al., 2012; YAN et al., 2005) e outras, demonstram atividade antibacteriana, como BIL, uma lectina obtida do veneno de *Bothrops leucurus*, que mostrou-se efetiva contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis* (NUNES et al., 2011).

Por outro lado, lectinas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) (MACEDO et al., 2007), *Arisaema helleborifolium* (AHL) (KAUR et al., 2006) e as VAC1 e VAC2 (ambas obtidas de *Viscum album*) (KEBURIA; KHURTSIDZE; GAIDAMASHVILI, 2010) possuem atividade inseticida.

### 3.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE

Uma das informações primordiais a serem conhecidas sobre um novo composto para que o mesmo possa ser utilizado biologicamente é a sua toxicidade, seja com relação ao seu alvo, seja com relação ao ambiente que o circunda.

O ensaio de letalidade, realizado com organismos simples, envolve apenas o parâmetro de morte ou vida. Este tipo de experimento tem sido utilizado para monitoramento

rápido e simples de resposta biológica, permitindo a avaliação da toxicidade geral e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (CAVALCANTE et al., 2000; COLEGATE; MOLYNEUX, 1993; MEYER et al., 1982; TAYLOR; CALDWELL; BENTLEY, 2005). A determinação da toxicidade de um composto geralmente utiliza animais invertebrados como modelo (CALDWELL; BENTLEY; OLIVE, 2003).

Dentre esses bioensaios, encontra-se a toxicidade sobre *Artemia salina* Leach, cujo primeiro trabalho relativo ao seu uso para esta finalidade foi publicado em 1956 (MICHAEL; THOMPSON; ABRAMOVITZ, 1956). Desde então, inúmeros artigos da literatura tem reportado sua utilização em estudos ambientais (PRICE; WAGGY; CONWAY, 1974; SORGELOOS; REMICHE-VAN DER WIELEN; PERSOONE, 1978; VANHAECKE et al., 1981), utilizando produtos e toxinas naturais, além de extratos de plantas (HARWIG; SCOTT, 1971; MEYER et al., 1982; SILVA et al., 2005).

Características como a facilidade na obtenção de sua larva; a simplicidade com que pode ser manuseada; a sensibilidade a uma ampla variedade de compostos com atividade biológica e diversas estruturas químicas (requerendo uma pequena quantidade de amostra); a rapidez e o baixo custo dos ensaios favorecem a sua utilização rotineira em diversos estudos, sendo tais ensaios de letalidade muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral (CAVALCANTE et al., 2000; LUNA et al., 2005; MEYER et al., 1982; PIMENTA et al., 2003).

### **3.3.1 *Artemia salina***

As espécies do gênero *Artemia* são encontradas em lagos salgados, salinas e ambientes marinhos. Estes organismos ganharam popularidade em bioensaios devido à sua facilidade de cultura – inclusive porque os organismos são suficientemente pequenos para permitir que um número estatisticamente válido seja mantido sob condições de laboratório, tempo de geração curto, distribuição cosmopolita e a disponibilidade comercial dos seus ovos dormentes (cistos), já que estes animais são comumente utilizados como alimento para peixes. Além disso, a partir do momento que os animais eclodem dos cistos apresentam idade, genótipo e condições fisiológicas similares, a variabilidade do teste é muito reduzida (BARAHONA; SANCHEZ-FORTUN, 1999; CAVALCANTE et al., 2000; HSU; CHICHESTER; DAVIES, 1970; LUNA et al., 2005).

*Artemia salina* Leach (Artemiidae) é um invertebrado componente da fauna dos

ecossistemas aquáticos salinos e marinhos (MCLAUGHLIN; CHANG; SMITH, 1991; PARRA et al., 2001). Já foi até mencionada como a “*Drosophila* aquática”, pois é o crustáceo mais conhecido do ponto de vista molecular e, portanto, um dos organismos aquáticos mais estudados até hoje (CORRÊA; PENAFORT, 2011).

Segundo Sorgeloos et al. (1986), a *Artemia* sp. possui a seguinte classificação taxonômica: Reino – Animalia; Filo – Arthropoda; Classe – Crustacea; Subclasse – Branchiopoda; Ordem – Anostraca; Família – Artemiidae; Gênero – *Artemia*, Leach (1819).

O indivíduo adulto apresenta de 8 a 10 mm de comprimento, corpo alongado, segmentado e dividido em cabeça, tórax e abdome. Seu trato digestivo é linear e existem onze pares de toracópodos funcionais, os quais são responsáveis pela natação, alimentação (através da filtração) e respiração. Machos e fêmeas são facilmente diferenciáveis. Nos indivíduos masculinos, as antenas diferenciaram-se num órgão que auxilia a cópula, segurando a fêmea; e esta última apresenta uma bolsa incubadora próxima ao último par de toracópodos (**Figura 9**) (VAN STAPPEN, 1996).

Seus ovos, quando secos, podem ser conservados durante muitos anos, estando sempre aptos a eclodirem, desde que sejam colocados em água (MORRIS, 1971).

**Figura 9** – Dois espécimes de *Artemia salina*: macho à esquerda e fêmea à direita

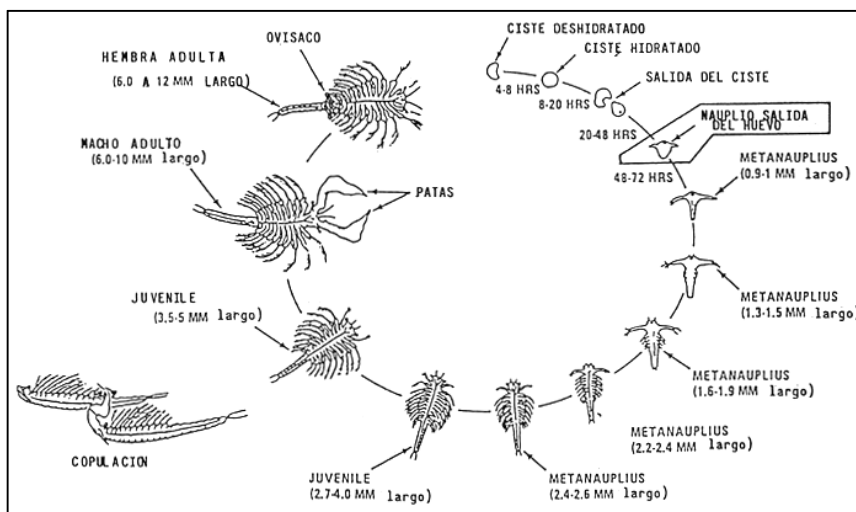


Fonte: <<http://biologiaacontecendo.blogspot.com.br/2012/04/artemia-salina.html>>

*A. salina* é considerada uma espécie extremamente eurialina, suportando salinidades entre 3 e 300 ppt. Por isso, têm sido largamente utilizada para a avaliação da contaminação de águas salinas e/ou marinhas por agentes químicos. Pode até sobreviver curtos períodos de tempo em água doce, mas não pode se reproduzir nele. Sobrevive a temperaturas variando de 15 a 55 °C (BARAHONA; SÁNCHEZ-FORTÚN, 2007; TREECE, 2000).

Segundo Igarashi (2008), o ciclo de vida da *Artemia* sp. pode ser dividido em quatro estágios morfológicos de desenvolvimento: náuplio, metanáuplio, pré-adulto (ou jovem) e adulto (**Figura 10**).

**Figura 10** – Ciclo de vida de *A. salina*.



Fonte: <<http://www.fao.org/docrep/field/003/AC410S/AC410S03.htm>>

O ensaio de letalidade da *A. salina* demonstrou boa correlação com a questão da citotoxicidade geral contra algumas linhagens de tumores sólidos humanos e com a atividade pesticida (ANDERSON et al., 1991; MCLAUGHLIN; CHANG; SMITH, 1991; RAMACHANDRAN et al., 2011). Além disso, pode ser utilizado para expressar a toxicidade de um extrato com atividade moluscicida contra organismos não-alvos, como peixes e pequenos crustáceos (LIMA et al., 2002).

### 3.3.2 *Biomphalaria glabrata* e a esquistossomose mansônica

Entre as doenças parasitárias humanas, a esquistossomose continua a ser uma das mais prevalentes, com consequências significativas para a economia e a saúde pública (CHITSULO et al., 2000).

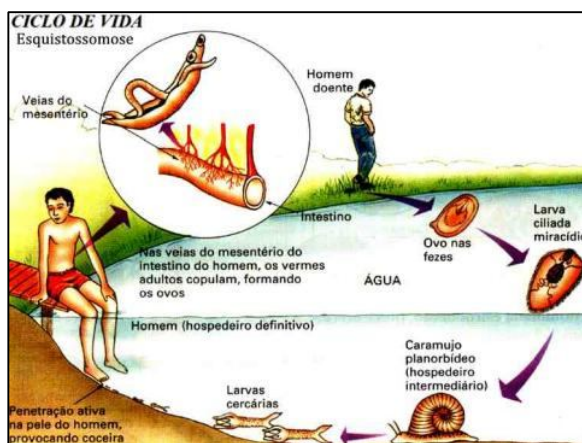
A esquistossomose é uma doença crônica, debilitante, causada pela infestação do hospedeiro pelo parasita *Schistosoma* sp., um verme trematoide que vive no sangue durante um estágio de seu ciclo de vida, e que afeta mais de 200 milhões de pessoas (KING; DANGERFIELD-CHA, 2008; LUNA et al., 2005).

Embora certo número de espécies de *Schistosoma*, tais como *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. intercalatum*, possa causar doenças humanas sistêmicas, o principal agente da esquistossomose humana é o *S. mansoni*, a espécie mais comum no Brasil (LEMMICH et al., 1995; LUNA et al., 2005; POINTER; GIBODA, 1999).

A transmissão da esquistossomose acontece quando o homem contaminado defeca próximo a coleções de água doce, parada ou com pouca correnteza, onde se encontra o molusco hospedeiro intermediário, liberando os miracídios dos ovos presentes nas fezes, que irão contaminar o caramujo. Tendo completado o estágio larval, o molusco libera na água as larvas infectantes para o homem, chamadas de cercárias, que entram pela pele (NEVES, 2005) (**Figura 11**). Soluções permanentes para este problema incluem a restrição de contato humano com água poluída e prevenção de novas contaminações do meio ambiente (CHITSULO et al., 2000; LUNA et al., 2005).

Aproximadamente sete semanas após a infecção transcutânea inicial, a produção de ovos começa nas tributárias da veia mesentérica inferior. Depositados por via intravascular, os ovos penetram na parede do vaso para atingir o íleo terminal e o cólon, levando a uma inflamação aguda. Depois de penetrar na mucosa, os ovos são excretados juntamente com as fezes. No entanto, 50% dos ovos permanecem aprisionados no interior da parede do intestino. Devido à liberação de substâncias antigênicas, a deposição de ovos leva à inflamação crônica granulomatosa, resultando em lesões e disfunção intestinais (ABDU, 2009; ABDU, 2012; HERBERT et al., 2010; MOREELS et al., 2001; WEINSTOCK, 2002).

**Figura 11** – Transmissão do *S. mansoni*.



Fonte: <<http://www.casal.al.gov.br/sevicos-oferecidos/outros-servicos/meio-ambiente/attachment/esquistossomose-2/>>

O desenvolvimento das larvas de *Schistosoma* ocorre em várias espécies de caracóis pertencentes ao gênero *Biomphalaria*, porém o gastrópode de água doce *B. glabrata* (**Figura 12**) é o principal hospedeiro intermediário da esquistossomose nas Américas do Sul e Central (ALVES et al., 2000; LEMMICH et al., 1995; PERRETT; WHITFIELD, 1996; POINTER; GIBODA, 1999; VERJOVSKI-ALMEIDA; DEMARCO, 2004).

**Figura 12** – Aspecto geral do molusco *Biomphalaria glabrata*.



Fontes: <[http://www.afpmb.org/pubs/Field\\_Guide/Images/originals/Fig.%20274.jpg](http://www.afpmb.org/pubs/Field_Guide/Images/originals/Fig.%20274.jpg)> e  
<[http://www.cre6-rjrj.blogspot.com.br/2012\\_06\\_13\\_archive.html](http://www.cre6-rjrj.blogspot.com.br/2012_06_13_archive.html)>

Com relação à sua taxonomia, *B. glabrata* possui a seguinte classificação: Reino – Animalia; Filo – Mollusca; Classe – Gastropoda; Subclasse – Pulmonata; Ordem – Basommatophora; Família – Planorbidae; Gênero – *Biomphalaria*, Say (1818). Os animais são hermafroditas, e a concha de exemplares adultos mede de 20 mm a 40 mm de diâmetro; de 5 mm a 8 mm de largura e apresenta cerca de 6 a 7 giros; e as paredes laterais dos giros são arredondadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; SOUZA; LIMA, 1992).

Para o controle da esquistossomose, além do tratamento dos pacientes infectados, é muito importante que as populações de caramujos sejam controladas como uma forma de redução do risco de transmissão da doença (SILVA FILHO et al., 2009).

Um método plausível de atacar e quebrar o ciclo evolutivo de *S. mansoni* (verme-ovo-miracídio-esporocisto-cercárias-verme) é através do controle ou tratamento profilático das massas de água que servem como locais de transmissão, utilizando-se agentes moluscicidas que destruirão o seu hospedeiro intermediário, o caramujo (ou caracol), no qual a transformação de miracídios para cercárias ocorre. Este constitui o elo mais fraco no ciclo de transmissão e é o ponto lógico de ataque para controlar a doença (LUNA et al., 2005; PERRETT; WHITFIELD, 1996).

### 3.3.2.1 Agentes moluscicidas

O alto custo das drogas moluscicidas sintéticas, juntamente com preocupações sobre a sua toxicidade para organismos não-alvo e o possível desenvolvimento de resistência do caracol, tem levado a uma procura de alternativas mais baratas (LEMMICH et al., 1995; POINTER; GIBODA, 1999). Logo, novos agentes moluscicidas seguros e eficazes são urgentemente necessários, porém, estes produtos devem ser estáveis, baratos, de fácil aplicação e mostrar toxicidade altamente seletiva para o organismo alvo (SINGH; MISRA; AGRAWAL, 1996).

O interesse pela busca de agentes moluscicidas de origem vegetal data da década de 1930, quando foi sugerido por R. G. Archibald o plantio de *Balanites aegyptiaca* L. (Balanitaceae), uma árvore típica do deserto, nas margens dos focos de transmissão da esquistossomose, no Sudão. Os frutos, ao caírem das árvores, inibiam a densidade populacional de caramujos (CANTANHEDE et al., 2010). Desde então, as propriedades moluscicidas de numerosos extratos de plantas têm sido estudadas com o objetivo de desenvolver-se uma tecnologia acessível e barata, apropriada para uso pelas comunidades locais no controle do vetor (MENDES et al., 1997).

Na busca por produtos com alto potencial moluscicida a partir de extratos vegetais, muitos autores se dedicaram à pesquisa de plantas regionais. No Brasil, vários estudos podem ser citados, como o realizado por Lopes et al. (2011), que, ao comprovarem a presença de saponinas e esteroides em altas concentrações no extrato hidroalcoólico das folhas do pequiheiro (*Caryocar brasiliense*), se interessaram em avaliar sua ação frente ao *B. glabrata*. Dos Santos e Sant'Ana (2000) testaram vinte e sete extratos brutos de vinte e seis espécies utilizadas na medicina popular brasileira, pertencentes a dezenove famílias diferentes. Das espécies vegetais testadas por estes pesquisadores, *Derris* sp., *Annona muricata*, *Jatropha elliptica* e *Renealmia exaltata* foram consideradas plantas moluscicidas promissoras.

Cantanhede et al. (2010) reúnem em seu artigo várias referências que comprovam a atividade moluscicida de espécies vegetais (**Tabela 1**).

Segundo a OMS (WHO, 1965), algumas características para um moluscicida ideal são: (1) apresentar uma alta atividade moluscicida geral; de baixa toxicidade em mamíferos e relativamente barato; (2) um combinado herbicida/moluscicida; e (3) um composto altamente específico para os caracóis. Outros atributos desejáveis são: (1) a estabilidade na sua formulação sob diferentes condições ambientais e de armazenamento antes da utilização; (2) segurança para o operador e facilidade de aplicação; e (3) baixo custo de tratamento.

**Tabela 1** – Atividade moluscicida de espécies vegetais.

Família	Planta	Parte utilizada	Extrato	Conc.*	Caramujo	Tempo**	Mortalidade	Referência
Annonaceae	<i>Anona crassiflora</i> M.	polpa, semente, caule, raiz	Etanólico	20	<i>B. glabrata</i>	24	90	Santos e Santana et al., 2001
	<i>A. glabra</i> L.	folha e semente	Etanólico	20	<i>B. glabrata</i>	24	90	
	<i>A. pisonis</i> M.	Caule	Etanólico	20	<i>B. glabrata</i>	24	90	
	<i>A. salzmanii</i> D.	Folha	Etanólico	20	<i>B. glabrata</i>	24	90	
	<i>A. squamosa</i> Vell	Raízes	Etanólico	20	<i>B. glabrata</i>	24	90	
	<i>A. muricata</i> L.	folha e caule	Etanólico	20	<i>B. glabrata</i>	24	90	
	<i>A. muricata</i> L.	Folha	Etanólico	100	<i>B. glabrata</i>	96	100	
Apocynaceae	<i>Thevetia peruviana</i>	látex		1,02	<i>L. acuminata</i>	24	90	Singh et al., 2005
	<i>Alstonia scholaris</i>	Látex		5,97	<i>L. acuminata</i>	24	90	
Asclepidaceae	<i>Marsdenia altissima</i> (Jacq)	Casca	Etanólico	100	<i>B. glabrata</i>	96	80	Luna et al., 2005
Asteraceae	<i>Chrysanthemum viscidhirtum</i> Schott. Tell	partes aéreas		1500	<i>B. truncatus</i>	24	100	Khallouki et al., 2000
	<i>Senecio santelisis</i> Phil	Folha	Clorofórmico	50	<i>B. peregrina</i>	24	50	
Caryocaceae	<i>S.leucostachys</i> Baker	Folha	Clorofórmico	85		24	50	Bezerra et al., 2002
	<i>Caryocar brasiliensis</i> Camb.	folha e casca	Etanólico	100	<i>B. glabrata</i>	48	90	
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	partes aéreas	Hexânico	2,23	<i>B. truncatus</i>	24	90	Hmamouchi et al., 2000
	<i>Licania carri</i> Cardozo	Folha	Metanólico	100	<i>B. glabrata</i>	24	100	
Chrisobalanaceae	<i>L. pittieri</i> Prince	Folha	Metanólico	100	<i>B. glabrata</i>	24	100	Bilia et al., 2000
	<i>L. pyrifolia</i> Griseb	Folha	metanólico e clorofórmico	100	<i>B. glabrata</i>	24	50	
Compositae	<i>Calendula micrantha</i> Officinalis	Flor		98	<i>B. alexandrina</i>	24	50	Rawi et al., 1996
		Flor		81	<i>B. truncatus</i>	24	50	
		Folha		107	<i>B. alexandrina</i>	24	50	
		Folha		81	<i>B. truncatus</i>	24	50	
	<i>Euphorbia conspicua</i>	Látex	Etanólico	4,87	<i>B. glabrata</i>	96	90	
Euphorbiaceae	<i>E. helioscopia</i>	folha seca	Metanólico	50,8		24	50	Santos et al., 2007
	<i>Jatropha glauca</i>	caule fresco	Hexânico	23	<i>B. pfeifferi</i>	24	50	
		folha seca	Clorofórmico	16,5		24	50	
	<i>E. pulcherrima</i>	Látex		0,25	<i>L. acuminata</i>	24	90	
	<i>E. schimperiana</i>	caule seco	Metanólico	7,6	<i>B. pfeifferi</i>	24	50	
Heliantheae	<i>Wedelia subvaginata</i> N. E. Br	folhas frescas	Clorofórmico	2,2		24	50	Bardon et al., 2007
	<i>Caryopteris x clandonensis</i> Simmonds	Raiz	Clorofórmico	5	<i>B. truncatus</i>	24	100	
Lamiaceae	<i>Citrus aurantium</i>	Óleo		0,28	<i>B. truncatus</i>	24	50	Lahlou e Berrada, 2001
	<i>Origanum compactum</i> Benth.			44	<i>B. truncatus</i>	24	50	
	<i>O. compactum</i> Benth.	partes aéreas	Acetato de Etila	2	<i>B. truncatus</i>	24	90	



Cont.

Família	Planta	Parte utilizada	Extrato	Conc.*	Caramujo	Tempo**	Mortalidade	Referência
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	Folha	aquoso	2,56	<i>L. acuminata</i>	24	50	Singh et al., 1996
		Caule	aquoso	1,86	<i>L. acuminata</i>	24	50	
		Óleo	aquoso	17,35	<i>L. acuminata</i>	24	50	
Mimosoideae	<i>Stryphnodendrom adstringens</i> Mart.	folha e casca	etanólico	100	<i>B. glabrata</i>	48	100	Bezerra et al., 2002
			etanólico	50	<i>B. glabrata</i>	48	90	
	<i>S. polyphyllum</i>	folha e casca	etanólico	100	<i>B. glabrata</i>	48	100	
			etanólico	50	<i>B. glabrata</i>	48	70	
Myrtaceae	<i>Eugenia dysenterica</i>	folha	etanólico	100	<i>B. glabrata</i>	48	100	Bezerra et al., 2002 Singh e Kumar, 2006
	<i>Syzygium aromaticum</i>	botão da flor	aquoso	51,98	<i>L. acuminata</i>	96	50	
Rubiaceae	<i>Gardenia thunbergia</i> L.f.	folha	etanólico	83,53		24	50	Clark et al., 1997
			aquoso	571	<i>B. truncatus</i>	24	50	
Rutaceae	<i>Ruta chalepensis</i> L.	partes aéreas	hexânico	3,52	<i>B. truncatus</i>	24	90	Hmamouchi et al., 2000
Solanaceae	<i>Solanum aculeastrum</i>	frutos	metanólico	50	<i>B. pfeifferi</i>	24	100	Wanyonyi et al., 2003 Silva et al., 2006
	<i>S. jabrense</i>	folha	etanólico	39,8	<i>B. glabrata</i>	24	90	

\*ppm (µg/L); \*\* tempo de exposição dos caramujos (horas).

Fonte: CANTANHEDE et al., (2010).

O conhecimento popular tem sido uma importante fonte de informações para a pesquisa científica em diversas áreas de estudo. Investigações etnofarmacológicas e etnobotânicas têm sido utilizadas como a principal estratégia para a seleção de plantas com diversas atividades biológicas, encurtando assim o tempo para a descoberta de novas drogas, já que a abordagem etnodirigida consiste na seleção de espécies de acordo com a indicação de grupos populacionais específicos em determinados contextos de uso, enfatizando a busca pelo conhecimento construído localmente a respeito de seus recursos naturais. Principalmente a partir da década de 1990, quando houve a publicação de trabalhos sobre o potencial de tais investigações para descoberta de novos fármacos, a pesquisa envolvendo os saberes e práticas “tradicionais” ganharam novo sentido indo além da simples compilação de plantas e animais (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Plantas medicinais tornaram-se, então, o foco de atenção como fonte de agentes moluscicidas, uma vez que em geral são menos caras e menos perigosas para o ambiente do que compostos sintéticos. Logo, considerando-se a medicina popular tradicional ou a literatura etnofarmacológica, há uma facilidade maior para a descoberta de novas espécies de plantas que apresentam atividade moluscicida. No entanto, antes da aplicação de um novo moluscicida natural a qualquer um dos recursos hídricos, é essencial a determinação dos possíveis efeitos tóxicos dos componentes ativos em organismos aquáticos não-alvo e em

aves e mamíferos, particularmente se existe uma possibilidade de os compostos presentes na preparação acumularem-se em produtos alimentares de origem aquática através da cadeia alimentar (BILIA et al., 2000).

### 3.4 CÂNCER

#### 3.4.1 Conceito e generalidades

Atualmente, o câncer é um dos problemas de saúde pública mais complexos que o sistema de saúde brasileiro enfrenta, dada a sua magnitude epidemiológica, social e econômica. Afeta os seres humanos com alta frequência e contribui significativamente para a morbidade e mortalidade globais. Ressalta-se que pelo menos um terço dos novos casos de câncer que ocorre anualmente no mundo poderia ser prevenido (MARTINKOVA et al., 2009; INCA, 2012). Outro fato digno de atenção é que a carga global de câncer continua a aumentar, em grande parte por causa do envelhecimento e crescimento da população mundial ao lado de uma crescente adoção de comportamentos causadores de câncer, particularmente o tabagismo, nos países em desenvolvimento econômico (JEMAL et al., 2011).

A palavra câncer vem do grego *karkínos*, que quer dizer caranguejo, e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina, que viveu entre 460 e 377 a. C. O câncer não é uma doença nova. O fato de ter sido detectado em múmias egípcias comprova que ele já comprometia o homem há mais de 3 mil anos antes de Cristo. Atualmente, câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças heterogêneas que afetam drasticamente a humanidade, e que tem em comum o crescimento desordenado de células, que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos, podendo apresentar-se de várias formas, incluindo formações em tecidos sólidos (sarcomas, carcinomas) e tumores de células isoladas (leucemias e linfomas) (CERQUEIRA, 2000; DESCH, 2002; INCA, 2012; KLUG; CUMMINGS, 2002; THOMAS, 2003).

De acordo com Mendelsohn (1995) os termos *câncer*, *neoplasia* e *processo maligno* são geralmente utilizados como sinônimos, tanto na literatura técnica quanto na popular.

O câncer é comumente descrito como uma doença de mutações em genes que regulam caminhos essenciais da função celular levando a um crescimento exagerado e descontrolado das células do tecido. Estas mutações podem ocorrer devido à ação de agentes carcinogênicos, como radiação ionizante, agentes químicos (como a nicotina e o tabaco) e físicos, hormônios (como o estradiol) e alguns vírus (como o de Epstein-Barr, o da hepatite B, e os

papilomavírus humanos 16 e 18). No entanto, evidências epidemiológicas e clínicas apontam para o importante, porém multifacetado, papel do hospedeiro (FERNANDES JÚNIOR, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2000; HOUGHTON et al., 2005; KLUG; CUMMINGS, 2002; LIEHR, 2000; THOMAS, 2003; WEST et al., 2003).

O tumor maligno raramente é o resultado de uma única mutação ou perda de um alelo supressor. Há evidências de que é necessário mais que uma única mutação para transformar uma célula normal em uma célula cancerosa. As alterações de DNA podem incluir um único ponto de troca de nucleotídeos, deleção, amplificação, translocação, rearranjo cromossômico, metilação ou outros eventos que podem, então, levar à ativação de oncogenes e inativação dos genes supressores tumorais. Normalmente, um acúmulo de alterações de DNA, de forma irreversível, por um período de muitos anos, transforma célula normal em uma cancerosa. Anteriormente, pensava-se que a desregulação de quantidade limitada de oncogenes ou genes supressores de tumores causava câncer, no entanto, mais recentemente, as alterações de muitos outros genes envolvidos direta ou indiretamente no processo de carcinogênese e no processo de progressão do tumor foram demonstradas (ALBERTS et al., 1999; DESCH, 2002; MARTINKOVA et al., 2009).

A patogênese do câncer, chamada *tumorigênese* ou *carcinogênese*, é um processo de múltiplos passos regulado por alterações genéticas e epigenéticas cumulativas, que requer a divisão das células constitutivas, seu crescimento e sobrevivência. Uma estratégia utilizada pelas células cancerosas para regular as vias de crescimento e sobrevivência é através da produção autócrina de fatores de crescimento e sobrevivência. Já os mecanismos de controle epigenético envolvem mudanças de padrões de expressão de genes mediada por modificações do DNA e/ou histonas, sem a alteração direta da sequência de nucleotídeos dos genes (GRIVENNIKOV; KARIN, 2008; HOUGHTON et al., 2005; MARTINKOVA et al., 2009; NOWELL, 1976).

Uma interpretação simplista da carcinogênese de dois passos é: (1) a *iniciação*, ativando proto-oncogenes e/ou desativando genes supressores tumorais que regulam os circuitos celulares, controlando a divisão celular, sobrevivência, e senescência – os iniciadores tumorais induzem alterações genéticas que causam a ativação; e (2) *promoção*, necessária para a expansão das células iniciadas em lesões pré-malignas que progridem para massas de tumores malignos, motivada por sinais celulares e extracelulares que levam a células imortalizadas resistentes a sinais inibidores de crescimento e apoptose. Os detalhes moleculares da patogênese do câncer estão sendo rapidamente desvendados no nível celular, mas o que está faltando nesta “desconstrução” é como as respostas fisiológicas do hospedeiro

estão envolvidas nisso (HENNINGSS et al., 1993; HOUGHTON et al., 2005).

Contudo, outra etapa do processo carcinogênico que pode ser mencionada é a *progressão do tumor*. Enquanto a iniciação é breve e irreversível, a promoção e progressão do tumor são processos duradouros que até certo ponto podem ser revertidos, proporcionando assim uma base racional para a quimiointervenção. Acredita-se que a promoção de tumores depende de uma interação entre as células iniciadas e seu microambiente (ALBINI; SPORN, 2007) e a inflamação é um frequente promotor de tumor (KARIN, 2006).

O desenvolvimento e progressão do câncer são influenciados pela combinação de vários fatores incluindo genética, ambiente, alimentação e imunidade, bem como vários outros ainda a serem descobertos. Estudos epidemiológicos são particularmente eficazes para a identificação de fatores de risco de câncer, mas raramente elucidam os mecanismos subjacentes. Tais estudos indicam que o sobrepeso e a obesidade também estão associados com aumento de risco de câncer (MARTINKOVA et al., 2009; PARK et al., 2010).

Tal progressão até o estado de neoplasia maligna depende de um conjunto de capacidades necessárias: (1) crescimento incontrolável, (2) insensibilidade a sinais que inibem o crescimento, (3) a fuga da apoptose, (4) a aquisição de potencial replicativo ilimitado; (5) capacidade para formar e manter novos vasos sanguíneos (angiogênese), e (6) invasão e metástase. A identificação de genes alterados e vias de sinalização e suas metas poderiam levar à substancial melhoria na prevenção, no diagnóstico, no prognóstico e na terapêutica sob medida para os cânceres (HANAHAN; WEINBERG, 2000; MARTINKOVA et al., 2009).

Os tumores resultantes deste processo multi-etapa são estruturas complexas de células malignas incorporado em uma vascularização e rodeados por um estroma tumoral dinâmico constituído por várias células não-malignas, tais como fibroblastos e células mieloides (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). O meio do microambiente tumoral é semelhante à resposta inflamatória numa ferida em cicatrização, a qual promove a angiogênese, reorganização da matriz extracelular (ECM), e motilidade das células tumorais (COUSSENS; WERB, 2002).

Para se tornarem totalmente transformadas, células humanas primárias precisam contornar vários mecanismos celulares à prova de falhas que normalmente mantêm o crescimento celular sob controle. Esta proliferação desregulada ocorre quando o tumor adquire a autossuficiência, através da produção de seus próprios fatores de crescimento; ou por tornar-se insensível aos sinais anticrescimento. As MMPs (metaloproteinases da matriz extracelular), por exemplo, podem estar criticamente envolvidas na deterioração do equilíbrio entre crescimento e sinais de anticrescimento no microambiente tumoral, já que podem

influenciar a biodisponibilidade ou a funcionalidade de vários fatores importantes que regulam o crescimento (DROST; AGAMI, 2009; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010).

A “fuga” da apoptose (morte celular programada) é uma outra estratégia que aumenta o número de células e tamanho dos tumores. A apoptose é normalmente iniciada através de receptores extracelulares, tais como os receptores Fas, que ativam uma cascata proteolítica de caspases intracelulares, uma vez que eles encontram o ligante Fas, levando à degradação seletiva de compartimentos subcelulares e DNA nuclear (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010).

### 3.4.2 Metástase

O desfecho letal da grande maioria dos cânceres é devido à disseminação de células tumorais metastáticas e o desenvolvimento de tumores secundários em locais distantes (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010).

A metástase – último passo da progressão do tumor, no qual há a propagação de células da neoplasia primária para órgãos distantes e seu crescimento implacável – é o mais temível aspecto do câncer. Certos órgãos como o pulmão, fígado e ossos são os locais preferenciais para a formação de metástases (BERNARDS; WEINBERG, 2002; FIDLER, 2003; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010).

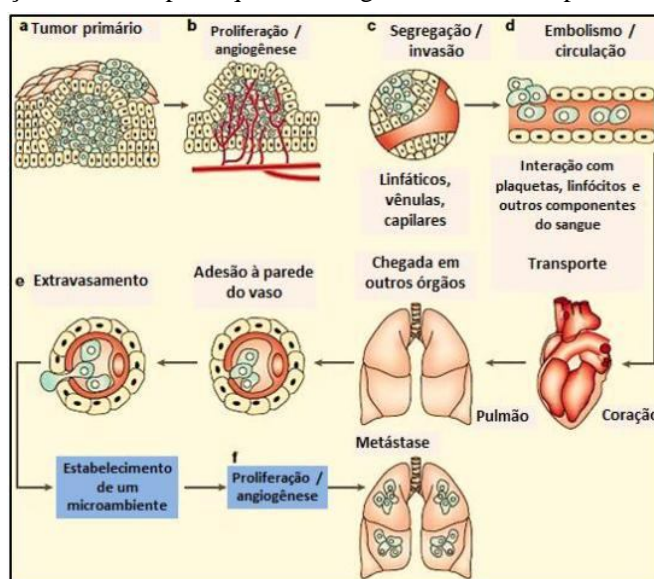
O fenótipo metastático inclui a capacidade de migrar do tumor primário, sobreviver no sangue ou na circulação linfática, invadir outros tecidos e estabelecer nódulos metastáticos distantes. O processo de metástase do câncer consiste em uma longa série de passos sequenciais, interligados (**Figura 13**) (FIDLER, 2003; RAMASWAMY et al., 2003).

De forma mais detalhada, a iniciação de metástases envolve a invasão do tumor no tecido periférico levando à entrada de células cancerosas no sangue ou nos vasos linfáticos, de onde se disseminam para órgãos secundários. Invasão e metástase exigem o cruzamento de várias barreiras físicas, tais como a membrana basal endotelial. A metástase não só depende das características das células cancerosas disseminadas do tumor primário, mas também requer a formação de um ambiente receptivo, um nicho metastático, que é especificamente adequado para o enxerto das células tumorais no órgão distante (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010).

Apesar das melhorias significativas no diagnóstico, técnicas cirúrgicas, cuidados gerais ao paciente e terapias adjuvantes locais e sistêmicas, a maioria das mortes por câncer são resultantes de metástases resistentes às terapias convencionais. A principal barreira para o

tratamento de metástases é a heterogeneidade biológica das células cancerosas na neoplasia primária e nas metástases. Além disso, o microambiente específico do órgão pode modificar a resposta de uma célula tumoral metastática à terapia sistêmica. O empirismo contínuo no tratamento da metástase do câncer é susceptível de produzir melhorias significativas na terapia. Portanto, compreensão a patogênese da metástase nos níveis sistêmico, celular e molecular são metas importantes da investigação do câncer (FIDLER, 2003).

**Figura 13** – Os principais passos na formação da metástase. a) Transformação celular e crescimento tumoral. b) Proliferação de células e vascularização (angiogênese). c) Invasão local do estroma hospedeiro por algumas células tumorais. d) Células tumorais individuais ou agregados celulares caem na corrente sanguínea (ou nos vasos linfáticos), sendo transportados para diversos órgãos. e) As células cancerosas extravasam e estabelecem um microambiente favorável ao seu desenvolvimento. f) Ocorre então a proliferação dentro do parênquima do órgão, concluindo o processo metastático.



Adaptado de: FIDLER (2003).

Atualmente, existem apenas terapias anti-câncer limitadas disponíveis, com uma eficácia muito variável, o que reflete uma taxa de cura insatisfatória. Apenas poucas terapêuticas dirigidas que inibem especificamente o crescimento de tumores com citotoxicidade geral mínima estão disponíveis. A identificação de genes alterados e vias de sinalização e suas metas poderiam levar à substancial melhoria na prevenção, no diagnóstico, no prognóstico e na terapêutica sob medida para os cânceres (GRIVENNIKOV; KARIN, 2008; MARTINKOVA et al., 2009).

### 3.4.3 Tratamento do câncer

A quimioterapia, a radioterapia e a excisão cirúrgica são os três métodos mais comuns e tradicionais de tratamento do câncer. Porém, devido aos efeitos colaterais da quimio e radioterapia, tem-se buscado novos caminhos para a cura, incluindo várias pesquisas com produtos naturais.

A diferença entre o sucesso ou o insucesso da quimioterapia depende não só da droga em si, mas também da forma como esta é entregue ao seu alvo. Por causa da ação relativamente inespecífica dos agentes quimioterapêuticos, há quase sempre alguma toxicidade ao tecido normal, mesmo sob condições ideais. Portanto, é de grande importância o agente antineoplásico ser capaz de atingir seletivamente o seu alvo, ou seja, o tumor, de forma tão precisa quanto possível, para reduzir os efeitos colaterais sistêmicos tóxicos resultantes da distribuição sistêmica generalizada e capaz de ser usado em uma dose muito menor, o que ainda conduziria a uma redução da toxicidade (ALEXIOU et al., 2000).

Dados etnofarmacológicos são obtidos através de consulta a “curandeiros” tradicionais e do acúmulo de informações sobre o uso medicinal popular de plantas, mas também a partir da literatura sobre medicina popular. Este tipo de pesquisa facilita a seleção de plantas superiores candidatas ao desenvolvimento de drogas com maiores possibilidades de sucesso (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001; MANS; ROCHA; SCHWARTSMANN, 2000).

Vários novos agentes anticâncer que entraram no mercado na década de 1990 foram obtidos a partir de fontes naturais (COX, 1994; FARNSWORTH, 1984).

Ao longo da história médica, compostos derivados de plantas têm sido de grande importância para a terapia do câncer. São exemplos os alcaloides de *Vinca*, os taxanos e as camptotecinas, derivados de *Catharantus roseus*, *Taxus brevifolia* e *Camptotheca acuminata*, respectivamente (**Tabela 2**) (MANS; ROCHA; SCHWARTSMANN, 2000).

Vinblastina e vincristina foram introduzidas pela primeira vez no final dos anos 1960 e tem contribuído para remissões a longo prazo e curas de leucemia infantil, teratoma testicular, doença de Hodgkin e muitos outros tipos de câncer. Mas a estrela inquestionável é o Taxol, obtido de *T. brevifolia*, mas que pode ser produzido a partir da conversão de uma estrutura química obtida de *T. baccata* e que demonstra a eficácia contra os cânceres de mama e ovário (GUPTA et al., 2004; MANN, 2002).

Várias pesquisas têm mostrado que lectinas podem exercer atividade inibitória sobre o crescimento de células tumorais, além de estimular o sistema imune (ABDULLAEV; MEJIA, 1997; ANDRADE et al., 2004; SHARON; LIS, 2002). Cra, lectina de *Cratylia mollis*

encapsulada em lipossomas, apresentou atividade antitumoral quando testada em camundongos portadores do Sarcoma 180 (ANDRADE et al., 2004). AAL, uma lectina purificada do cogumelo *Agrocybe aegerita*, mostrou-se tóxica às linhagens tumorais humanas HeLa, SW480, SGC-7901, MGC80-3, BGC-823 e HL-60 (ZHAO et al., 2003); e AHL, obtida do tubérculo de *Arisaema helleborifolium*, às linhagens HOP-62, HCT-15, HEP-2, HT-29, PC-3 e A-549 (KAUR et al., 2006). MCL, purificada de *Momordica charantia*, uma planta popularmente conhecida como melão-de-são-caetano, apresentou atividade antitumoral frente a células de carcinoma nasofaríngeo humano (NPC), tanto *in vitro* quanto *in vivo* (FANG et al., 2012). A lectina obtida de sementes de *Trichosanthes cucumerina* (TCSL) inibiu as células do carcinoma ascítico de Erlich (EAC) em camundongos (KABIR et al., 2012).

**Tabela 2** – Algumas drogas citotóxicas derivadas de fontes vegetais.

Droga	Mecanismo de ação	Fonte vegetal
Vinblastine, vincristine	Inibição da polimerização da tubulina	<i>Catharanthus roseus</i> (Apocynaceae)
Etoposide, teniposide	Inibição da topoisomerase II	<i>Podophyllum peltatum</i> , <i>P. emodi</i> (Berberidaceae)
Paclitaxel, docetaxel	Promoção da estabilização da tubulina	<i>Taxus brevifolia</i> (Taxaceae)
Irinotecan, topotecan, 9-aminocamptotecin, 9-nitrocamptotecin	Inibição da topoisomerase I	<i>Camptotheca acuminata</i> (Nyssaceae)
Homoharringtonine	Inibição da DNA polimerase $\alpha$	<i>Harringtonia cephalotaxus</i> (Cephalotaxaceae)
4-Ipomeanol	Conversão mediada pelo citocromo P450 em metabólitos ligadores de DNA	<i>Ipomoea batatas</i> (Convolvulaceae)
Elliptinium	Inibição da topoisomerase II	<i>Bleekeria vitensis</i> (Apocynaceae)
Flavopiridol	Inibição das quinases ciclina-dependentes	<i>Amoora rohituka</i> ; <i>Dysoxylum binectariferum</i> (Meliaceae)

Adaptada de: MANS; ROCHA; SCHWARTSMANN (2000).

### 3.5 INFLAMAÇÃO

A sobrevivência é impossível sem a defesa vigilante contra ataque e lesões. O sistema imune inato continuamente examina o corpo, buscando a presença de invasores. Quando encontra um ataque, ele involuntariamente coloca em movimento uma resposta inflamatória localizada, discreta, para impedir ameaças mais patogênicas. A magnitude da resposta inflamatória é crucial: respostas insuficientes resultam na imunodeficiência, o que pode levar a infecções e câncer; respostas excessivas causam morbidade e mortalidade em doenças tais como a artrite reumatoide, doença de Crohn, aterosclerose, enrijecimento arterial, diabetes, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, e isquemia cerebral e do miocárdio. Se a inflamação se espalha na corrente sanguínea, como ocorre na síndrome do choque séptico, sepse, meningite e traumas graves, as respostas inflamatórias podem ser mais perigosas do que o



estímulo original. A homeostase e a saúde são restauradas quando a inflamação é limitada por respostas anti-inflamatórias que são redundantes, rápidas, reversíveis e localizadas (MÄKI-PETÄJÄ; WILKINSON, 2012; TRACEY, 2002).

A inflamação promove a preservação da vida, como se reflete no risco aumentado de infecções graves em indivíduos com deficiências genéticas dos componentes principais do processo inflamatório (NATHAN, 2002).

A inflamação é um mecanismo de defesa do hospedeiro, uma resposta imediata do corpo a uma lesão do tecido provocada por uma infecção microbiana ou outros estímulos nocivos. É um conjunto complexo de interações entre fatores solúveis e células que podem surgir em qualquer tecido em resposta a uma injúria traumática, infecciosa, pós-isquêmica, tóxica ou auto-imune, e que levam ao acúmulo local de fluido plasmático e células sanguíneas com o objetivo de curar o tecido atingido e restaurar sua função (CHETTIBI; FERGUSON, 1999; CRONSTEIN; NATHAN, 2002; HANSEL; DINTZIS, 2007; KUNDUR; SURH, 2012; LAWRENCE; GILROY, 2007; TRACEY, 2002; WEISSMANN, 1993). Esta resposta é relativamente inespecífica, ou seja, o padrão inicial é independente do agente ou do evento causal (SILVERTHORN, 2003; STEVENS; LOWE, 2002).

O processo normalmente leva à recuperação da infecção e à cura. No entanto, se a destruição dirigida e a reparação assistida não são adequadamente faseadas, a inflamação pode levar a danos persistentes no tecido por leucócitos, linfócitos ou colágeno (NATHAN, 2002).

Todo o mecanismo inflamatório deve ser afinado e regulado precisamente, porque as deficiências ou excessos da resposta inflamatória causam morbidade e encurtam a vida. Por exemplo, se a inflamação persiste na ausência de um agente irritante ou microrganismo identificável, ela é muitas vezes tão destrutiva para o hospedeiro quanto qualquer invasor, como ocorre na artrite reumatoide (CRONSTEIN; WEISSMANN, 1993; TRACEY, 2002).

### **3.5.1 Inflamação aguda**

A resposta inflamatória é caracterizada pela ativação coordenada de diversas vias de sinalização que regulam a expressão de ambos os mediadores pró- e anti-inflamatórios em células residentes dos tecidos e nos leucócitos recrutados (LAWRENCE; GILROY, 2007).

Todo o fenômeno inflamatório engloba alguns sinais e sintomas característicos, chamados *sinais flogísticos* ou *cardinais*. O *calor* e o *rubor* resultam da dilatação dos vasos e aumento do fluxo sanguíneo na região inflamada; o *edema inflamatório* é provocado pelo

acúmulo de líquido e células inflamatórias (exsudato) nos espaços intersticiais, particularmente dos componentes fluidos; a *dor* é o resultado da pressão exercida pelo edema nas terminações nervosas e de um efeito direto de determinados fatores químicos liberados durante a resposta inflamatória. A *perda da função*, total ou parcial, na área inflamada, pode ser uma consequência direta da injúria ou secundária ao edema e dor marcantes provocados pelo próprio dano. Em situações experimentais *in vivo* as relações temporais dessa cascata de acontecimentos estão bem estabelecidas, isto é, edema e o acúmulo de leucócitos, especificamente leucócitos polimorfonucleares (PMNL), seguido por acúmulo de monócitos e macrófagos (FREDMAN; SERHAN, 2012; HANSEL; DINTZIS, 2007; SERHAN, 2009; STEVENS; LOWE, 2002).

A resposta inflamatória aguda possui três funções principais: (1) facilitar o encaminhamento das defesas locais (células e moléculas) para supressão da infecção; (2) destruir e eliminar um agente causal infectante pelos componentes do exsudato, gerando uma barreira física para evitar a disseminação da infecção; e (3) reparar o tecido lesado (HANSEL; DINTZIS, 2007; ROMERO et al., 2006; STEVENS; LOWE, 2002).

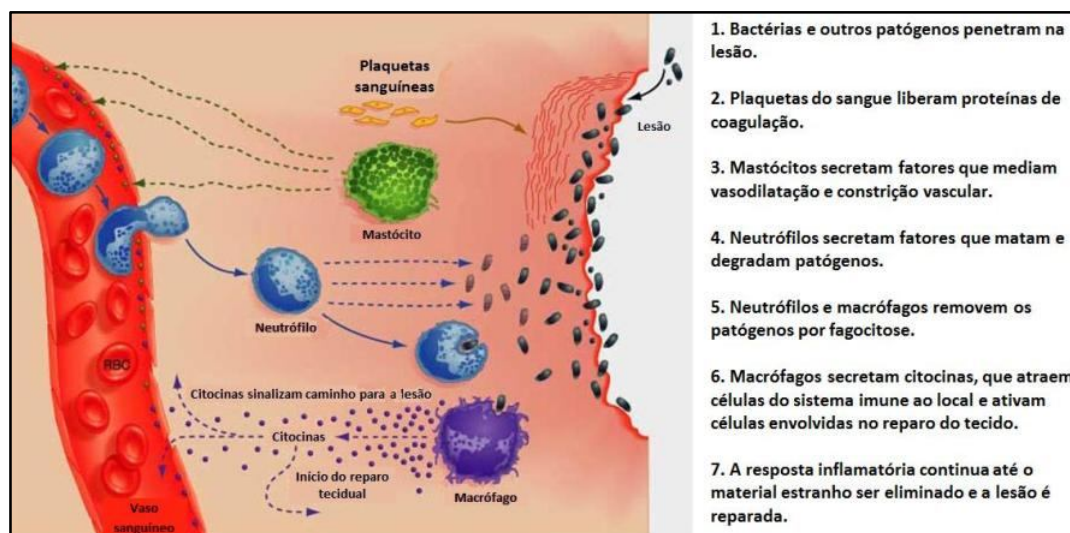
Para que todo este processo ocorra, há uma liberação sequencial de mediadores, vasodilatação, recrutamento de leucócitos a partir da circulação e sua infiltração, inicialmente de granulócitos polimorfonucleares seguidos pelos monócitos que se diferenciam em macrófagos localmente, para destruir agentes patogênicos invasores e então segue-se a fase de resolução rápida e reparação do tecido danificado. Esta resposta deve ser de vida curta e depende, acima de tudo, de um controle cuidadoso entre mediadores pró- e anti-inflamatórios. Assim, a inflamação aguda tem um papel benéfico contra a infecção e lesões (CHANG; LEE; LIN, 2001; HANADA; YOSHIMURA, 2002; KORHONEN et al., 2005; KUNDUR; SURH, 2012; MAJNO, 1975; RAISON; CAPURON; MILLER, 2006).

Invariavelmente, esta resposta é desencadeada por mastócitos e macrófagos residentes, cuja desgranulação e ativação sequencialmente liberam uma bateria de mediadores inflamatórios, incluindo aminas bioativas (histamina e 5-HT), citocinas, quimiocinas, assim como mediadores lipídicos que coletivamente recrutam e ativam células inflamatórias, bem como promovem a formação de edema (**Figura 14**). Embora este sistema tenha uma enorme capacidade de sinergia e redundância, ao longo dos anos serviu de base estável para o desenvolvimento e descoberta de medicamentos anti-inflamatórios, como desenvolvimento de inibidores anti-inflamatórios não-esteroides da síntese de eicosanoides no início dos anos 1960 até os tempos mais recentes, com a inibição das ações do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (LAWRENCE; GILROY, 2007).

### 3.5.2 Mediadores inflamatórios

Uma variedade de mediadores inflamatórios já é extensivamente conhecida. Estes podem ser considerados de ação rápida, como as aminas vasoativas (histamina, serotonina), ou de ação prolongada (substâncias plasmáticas, citocinas e lipídeos ácidos).

**Figura 14** – Representação simplificada do processo inflamatório.  
Adaptado de: <<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lect23.htm>>



As *aminas vasoativas* são liberadas na fase inicial da inflamação (1 – 1,5 horas) (LEE; KATAYAMA, 1992). A histamina é uma amina biogênica que desempenha um papel importante na regulação dos diferentes sistemas fisiológicos no corpo, como no controle da secreção do ácido gástrico; mas também desempenha um papel patofisiológico em muitas desordens alérgicas. É sintetizada a partir da descarboxilação da L-histidina em tipos celulares específicos, tais como mastócitos, basófilos e neurônios. A histamina promove vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, além de desempenhar um papel central na hipersensibilidade imediata e neurotransmissão (LING et al., 2004; NELSON, 2002; PARSONS; GANELLIN, 2009; RANG et al., 2004; SHIMAMURA et al., 2011; SIMONS; SIMONS, 1992; WHITE, 2004).

A serotonina (5-hidroxitriptamina) é um dos principais neurotransmissores no cérebro e também está envolvida em uma gama de ações periféricas. É de fato uma molécula com duas identidades funcionais diferentes, dependendo do seu local de síntese: um hormônio, quando originada do intestino e um neurotransmissor quando no cérebro. Funciona como mediador inflamatório e está envolvida na sensibilização de nociceptores e controle

microvascular (GLENNON; DUKAT, 2002; RANG et al., 2004; WALTHER et al., 2003; YADAV et al., 2008).

As *substâncias plasmáticas* envolvem sistema do complemento, sistema das cininas, sistema de coagulação e sistema fibrinolítico. São diversas cascatas de enzimas envolvidas na mediação da inflamação, compostas de uma série de proteases ativadas sequencialmente. São caracterizadas por um pequeno número inicial de proteínas que é amplificado a cada reação enzimática sucessiva. O sistema de cascata rapidamente produz uma grande resposta (HANSEL; DINTZIS, 2007).

As *citocinas* são polipeptídeos solúveis, que desempenham um papel crucial na mediação da resposta imune tanto na periferia quanto no sistema nervoso central (SNC) (AMANTEA et al., 2009; KAN et al., 2012). Este grupo engloba interferons, interleucinas, quimiocinas, fatores de estimulação de colônias e fatores de necrose tumoral. Podem ser divididas em pró- e anti-inflamatórias.

As *citocinas pró-inflamatórias* estão envolvidas na resposta imune inicial, ajudando a guiar a eliminação dos patógenos e a resolução do processo inflamatório. As primárias incluem TNF- $\alpha$  e a IL-1, as quais exercem papéis centrais. São liberadas por macrófagos e por muitas outras células, podendo desencadear uma cascata de citocinas secundárias, como as quimiocinas. Vários fatores de crescimento (por exemplo, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento dos fibroblastos, fator de crescimento endotelial vascular) são importantes nos processos de reparo e estão implicados na inflamação crônica (DINARELLO, 2012; MONTECUCCO; MACH, 2009; RANG et al., 2004; SCHULTZBERG et al., 2007).

As *citocinas anti-inflamatórias* diminuem as funções celulares e a síntese de citocinas pró-inflamatórias; incluem TGF- $\beta$  (fator transformante do crescimento  $\beta$ ), IL-4, IL-10 e IL-13. Essas citocinas podem inibir a produção de quimiocinas, e as três últimas têm a capacidade de inibir respostas mediadas por células Th1, isto é, as células cuja ativação inapropriada está envolvida em diversas doenças (AMANTEA et al., 2009; RANG et al., 2004; SCHULTZBERG et al., 2007).

Os *lipídeos ácidos* incluem prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs), leucotrienos (LTs) e o PAF (fator de ativação das plaquetas). As prostaglandinas e os leucotrienos são mediadores chave na inflamação. São sintetizados pela atividade das enzimas ciclooxigenase e 5-lipoxigenase, respectivamente, sobre o ácido araquidônico liberado das membranas celulares. Os tromboxanos também derivam da atividade da ciclooxigenase sobre o mesmo substrato. O PAF atua como um potente vasodilatador, além de causar o aumento da permeabilidade vascular, da adesão leucocitária ao endotélio, quimiotaxia e síntese de outros

mediadores (BLOEMEN et al., 2007; FREDMAN; SERHAN, 2012; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; MISSO; AGGARWAL; THOMPSON, 2012; PEREIRA, 2006; RANG et al., 2004; SAMUELSSON et al., 1987).

Geralmente a inflamação aguda pode ter um destes três resultados finais: *resolução completa* – que ocorre normalmente quando a lesão é limitada, de curta duração ou quando houver pouca destruição tissular e as células parenquimatosas danificadas podem ser regeneradas, restaurando a normalidade no local da inflamação, sendo o resultado ideal; *cicatrização pela substituição do tecido conjuntivo (fibrose)* – ocorre após uma lesão tecidual considerável, quando a lesão inflamatória envolve tecidos incapazes de se regenerar, ou quando existe um abundante exsudato de fibrina; e *progressão da resposta tecidual à inflamação crônica*. Neste último caso, a persistência da reação inflamatória parece ter se desligado do agente causador primário e os agentes anti-inflamatórios apenas promovem alívio sintomático e não alteram o curso da doença (KANTERMAN; SADE-FELDMAN; BANİYASH, 2012; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; SERHAN, 2009; SERHAN et al., 2007; STEVENS; LOWE, 2002).

### 3.5.3 Inflamação crônica

Em geral, a resposta imune inata é iniciada dentro de minutos, e, se necessário, é apoiada pela resposta imune adaptativa. Ambas as respostas são capazes de resolver a inflamação dentro de alguns dias. Em contraste, o fracasso para limpar os elementos perigosos ou o término ineficiente da resposta pode resultar em inflamação crônica, possivelmente levando ao aumento da morbidade devido à indução da imunossupressão (BANİYASH, 2006; GONDA; TU; WANG, 2009; KANTERMAN; SADE-FELDMAN; BANİYASH, 2012; LAWRENCE; GILROY, 2007).

Esta progressão de uma inflamação aguda para uma crônica como ocorre em muitas doenças humanas, tais como artrite, doença periodontal e doença cardiovascular, entre outras, é amplamente considerada como um excesso de mediadores pró-inflamatórios. Porém, a causa específica de uma inflamação crônica persistente não é completamente compreendida. Embora as células mononucleares por vezes possam contribuir para as respostas pró-inflamatórias, elas também são críticas na cicatrização de feridas, reparação e remodelação do tecido em uma forma não-inflamatória. Por isso, é possível que os defeitos associados com a montagem de circuitos pró-resolução endógenos e autacoides locais podem estar relacionados

a alguns dos mecanismos aberrantes na inflamação crônica (KANTERMAN; SADEFELDMAN; BANİYASH, 2012; SERHAN; SAVILL, 2005; SERHAN, 2009).

### 3.5.4 Tratamento da inflamação

Os agentes farmacológicos que inibem a resposta inflamatória aguda ou crônica pertencem a dois grandes grupos: *drogas anti-inflamatórias não-esteroidais* (AINE, ou em inglês, NSAID – nonsteroidal anti-inflammatory drugs), cujo protótipo é a aspirina, apresentam estrutura química variada e exercem atividade analgésica, antipirética, antitrombótica, uricosúrica e anti-inflamatória; e as drogas anti-inflamatórias esteroidais (SAID – steroidal anti-inflammatory drugs), cujo protótipo é a hidrocortisona, também chamados glicocorticoides, os quais são mais eficazes que os anteriores (COSSERMELLI; PASTOR, 1995; HOWLAND; MYCEK, 2006; LEE; KATAYAMA, 1992; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

Muitas destas terapias anti-inflamatórias amplamente utilizadas são dirigidas à inibição de enzimas e/ou antagonismo de receptores. Uma variedade de agentes anti-inflamatórios seguros e eficazes estão disponíveis para o controle a curto prazo da inflamação aguda. Ambos os inibidores seletivos da ciclo-oxigenase e do TNF- $\alpha$  são exemplos desta abordagem que são utilizados com o objetivo de bloquear a produção de mediadores químicos pró-inflamatórios (DINARELLO, 2012; SERHAN, 2009).

A aspirina, um dos agentes anti-inflamatórios mais conhecidos, inibe as enzimas ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2), que sintetizam as prostaglandinas e os tromboxanos. Na maioria das vezes, mesmo glicocorticoides de curto prazo são seguros e eficazes. Porém, para atacar as causas da inflamação é necessário um tratamento a longo prazo. Há uma nova era de agentes anti-inflamatórios tais como terapias anti-citocina, inibidores da quinase, estatinas, inibidores de histona desacetilase, e agonistas de PPAR (DINARELLO, 2012; SERHAN, 2009).

Um certo número de agentes tem sido desenvolvido para tratar a inflamação através da redução da atividade de citocinas específicas ou seus receptores (terapias anti-citocinas), bloqueio do tráfego de linfócitos para os tecidos, impedimento da ligação de moléculas co-estimulatórias de monócitos-linfócitos ou do esgotamento dos linfócitos B. As terapias anti-citocinas atuais têm encontrado um espaço no tratamento de doenças auto-imunes, tais como a artrite reumatoide, doença intestinal inflamatória, psoríase, e outros. Sem dúvida, a neutralização de citocinas pró-inflamatórias específicas têm demonstrado seu papel causal na

inflamação e mudou a vida de milhões de pacientes com estas doenças. Uma desvantagem das terapias anti-citocina é a diminuição da defesa imunológica do hospedeiro contra a infecção e possivelmente câncer. No entanto, os benefícios de terapias anti-citocinas superam os riscos e os riscos podem ser reduzidos (DINARELLO, 2012).

Várias lectinas, de diversas fontes, têm sido identificadas como potentes agentes anti-inflamatórios. Segundo Assreuy et al. (1997), DvL, CfL e DguiL, lectinas ligadoras de glicose/manose obtidas de *Dioclea violacea*, *Cratylia floribunda* e *D. guianensis*, respectivamente, inibiram a migração neutrofílica induzida por carragenina. CFAL, uma lectina obtida de sementes de *Clitoria fairchildiana*, promoveu redução no edema de pata induzido pelo mesmo agente flogístico (LEITE et al., 2012). Moura et al. (2012) provaram que a HGA, lectina obtida do equinoderma *Holothuria grisea*, possui efeito anti-inflamatório, sendo a primeira lectina originária de um invertebrado marinho a demonstrar esta propriedade.

### **3.5.5 Relação inflamação x câncer**

As respostas inflamatórias desempenham papéis decisivos em diferentes estágios de desenvolvimento de tumores, incluindo iniciação, promoção, transformação maligna, invasão e metástase. A inflamação também afeta a vigilância imunitária e as respostas ao tratamento. Células do sistema imunológico que se infiltram nos tumores se envolvem em um *crossstalk* extenso e dinâmico com as células cancerosas e alguns dos eventos moleculares que medeiam este diálogo foram revelados (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

O papel da inflamação na promoção do tumor tem sido extensivamente estudado e evidências recentes sustentam inclusive sua participação na metástase e na recorrência do tumor (BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005; BROMBERG; WANG, 2009; TAN et al., 2011). Tornou-se evidente que os efetores e mediadores celulares da inflamação são constituintes essenciais do ambiente local de todos os tumores, incluindo alguns em que uma relação causal direta com a inflamação ainda não está provada. Em alguns tipos de câncer, as condições inflamatórias estão presentes mesmo antes de a transformação maligna ocorrer. Numerosos estudos de laboratório e de base populacional sugerem que certas doenças malignas surgem em tecidos severamente danificados por uma inflamação crônica (HANAHAN; WEINBERG, 2011; HIRSCH et al., 2010; KUNDUR; SURH, 2012; MANTOVANI et al., 2008).

Vários tipos de inflamação, diferindo em mecanismo, causa, resultado, e intensidade podem promover o desenvolvimento e progressão do câncer. Estudos epidemiológicos confirmam que a *inflamação crônica* associada a infecções ou doenças auto-imunes precede o desenvolvimento de tumores e pode contribuir através da indução de mutações oncogênicas, instabilidade genômica, promoção precoce do tumor, e angiogênese aumentada. Por exemplo, infecções crônicas com os vírus das hepatites B e C e com *Helicobacter pylori* são fatores de risco para carcinomas hepatocelulares. Do mesmo modo, doenças inflamatórias crônicas como colite ulcerosa aumentam o risco de câncer colorretal (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; HOFFMANN; XIA; VERMA, 2007).

A *exposição prolongada a irritantes ambientais ou a obesidade* também podem resultar em inflamação crônica de baixo grau que precede o desenvolvimento do tumor e contribui para isto através dos mecanismos acima mencionados. Por exemplo, o excesso de peso pode promover um processo inflamatório no tecido mamário levando ao câncer de mama (AGGARWAL, 2004; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; TUMA, 2011).

A *inflamação associada ao tumor* anda de mãos dadas com o desenvolvimento do tumor, podendo ser a consequência ou o desencadeador da tumorigênese. Esta resposta inflamatória pode aumentar a neoangiogênese, promover progressão tumoral e metástase, causar imunossupressão local, e aumentar ainda mais a instabilidade genômica (AGGARWAL, 2004; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; LI; GRIVENNIKOV; KARIN, 2011).

A *terapia do câncer* também pode desencadear uma resposta inflamatória, causando trauma, necrose e lesão dos tecidos do tumor, que estimulam a re-emergência e resistência à terapia. No entanto, em alguns casos, a inflamação induzida pela terapia pode melhorar a apresentação de antígeno, conduzindo à erradicação do tumor mediada pela imunidade (**Figura 15**) (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

### 3.6 DOR

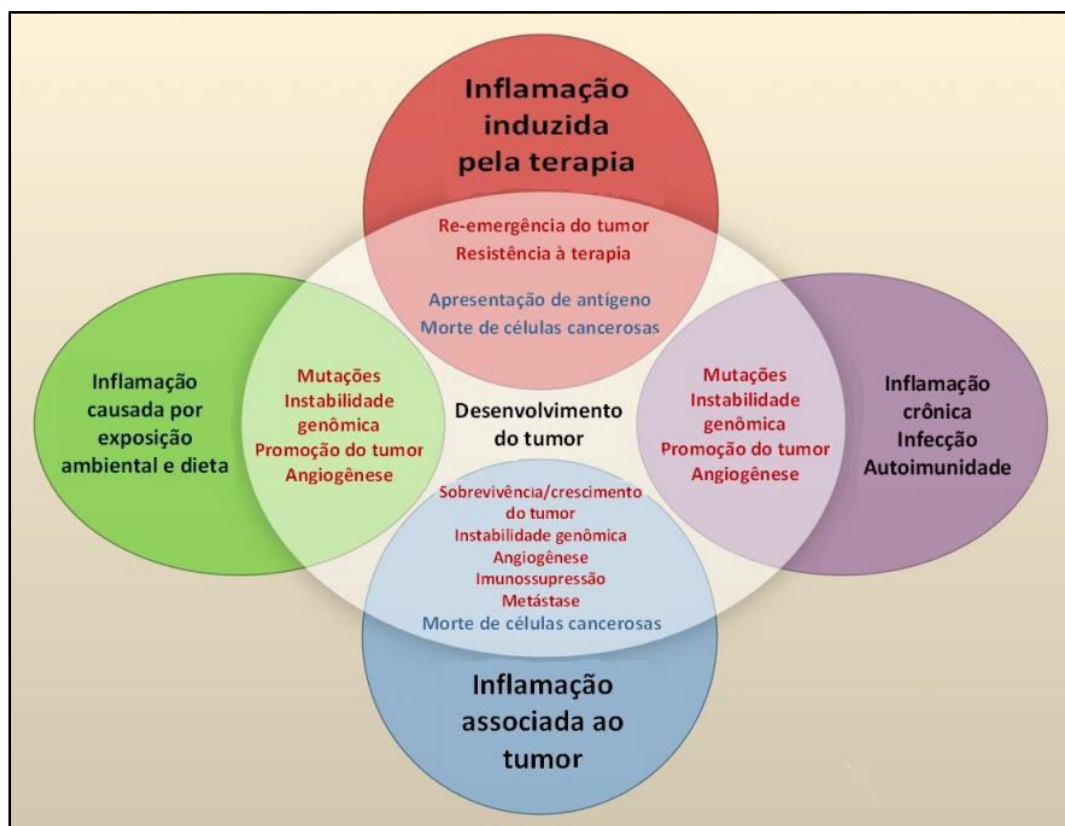
Uma das características do estado inflamatório é que estímulos normalmente inócuos produzem dor. A dor que se origina de tecidos inflamados ou que sofreram injúria é caracterizada pela hipersensibilidade no local do dano e no tecido adjacente, promovida pela liberação de mediadores inflamatórios pelo tecido lesado que estimulam os neurônios sensoriais periféricos; e pode surgir na ausência de um gatilho externo. No contexto da inflamação, as respostas a estímulos nocivos podem ser maximizadas (*hiperalgesia*) ou



estímulos normalmente inócuos podem produzir dor (*alodinia*). Um mecanismo que permeia esse fenômeno é a modulação (sensibilização) dos canais iônicos, como os TRPV1, que detectam o estímulo nocivo no terminal do nociceptor (ELKARADAWY et al., 2012; KIDD; URBAN, 2001; WANG et al., 2008).

A Associação Internacional do Estudo da Dor (IASP) definiu a dor como “*uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tissular presente ou potencial*”. Contudo, muitas vezes, manifesta-se mesmo na ausência de agressões teciduais vigentes, envolvendo aspectos emocionais, psicológicos e comportamentais da percepção da dor. Logo, sua percepção envolve dois componentes: o estímulo doloroso (nocicepção) e a reação emocional à dor (DAUDT et al., 1998; HANSON, 2004; MIYAKE; REIS; GRISI, 1998; PRADO, 2001; SMITH, 1992; WALL; MELZACK, 1994).

**Figura 15** – Tipos de inflamação na tumorigênese e câncer. Fatores promotores do tumor são apresentados em vermelho e fatores antitumorigênicos em azul.



Modificado de: GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, (2010).

A dor é, ainda, o sintoma prevalente entre os pacientes com câncer, devido principalmente às metástases, e em aqueles com câncer avançado (BENNETT et al., 2012; BONICA; VENTAFRIDA; TWYLCROSS, 1990; FISCH et al., 2012).

### 3.6.1 Os principais tipos de dor

Essencialmente, devemos reconhecer dois tipos de dor: a *aguda* (ou *fisiológica*) e a *crônica* (ou *patológica*) (PRADO, 2001).

A dor aguda é simplesmente um sintoma de uma doença subjacente ou lesão. Resulta da estimulação nociva intensa ou potencialmente injuriante, é bem localizada, e que medidas especiais sejam adotadas. Geralmente é causada por processos identificáveis, sejam inflamatórios, espásticos ou isquêmicos (HUNG et al., 2012; LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000; MELZACK, 1992; PRADO, 2001).

A dor crônica é mais que um sintoma. Ocorre em resposta à lesão tecidual e é caracterizada pela sensação de dor em resposta a estímulos normalmente inócuos ou mesmo pela ocorrência de dor espontânea, manifestando-se de modo contínuo ou recorrente por mais tempo do que o esperado para a cura da lesão. Muitas vezes apresenta etiologia incerta, não desaparece com o emprego dos procedimentos terapêuticos convencionais e é causa de incapacidades e inabilidades prolongadas. Sua presença constante e duração prolongada, em geral, são muito perturbadoras. Acarretam alterações nas atividades físicas, no sono, na vida sexual, modificação do humor, baixa auto-estima, pensamentos negativos, apreciação desesperançada da vida, altera relações familiares, de trabalho e de lazer. Na fase crônica, a dor está geralmente associada a alterações ou danos ao tecido nervoso, caracterizando-se a *dor neuropática*, comum especialmente em idosos. Nesta condição, a dor aparentemente perde qualquer função adaptativa e torna-se de fato patológica (DJOUHRI et al., 2012; FERREIRA; TORRES, 2004; HUNG et al., 2012; MCQUAY, 2002; MERSKEY; BOGDUK, 1994; PERISSINOTTI, 2001; PIMENTA, 1999; PRADO, 2001; TURK; OKIFUJI, 2001).

### 3.6.2 Nociceção e a condução do estímulo doloroso

A *nociceção* refere-se à percepção e à resposta do corpo à dor, ou seja, é atividade do sistema nervoso aferente, induzida por estímulos nocivos, tanto exógenos (mecânicos, químicos, físicos e biológicos) quanto endógenos (inflamação, aumento de peristaltismo, isquemia tecidual). Sua recepção em nível periférico se dá em estruturas específicas

denominadas *nociceptores*, os quais são terminações nervosas das fibras nociceptivas A $\delta$  e C e que estão localizados na pele e vísceras. Estes podem ser ativados por estímulos mecânicos, térmicos e químicos, cuja responsividade pode ser modulada por meio da ação de prostaglandinas, cininas, catecolaminas, íons H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e substância P (um neurotransmissor específico das fibras condutoras do estímulo doloroso). Tais estímulos são traduzidos em estímulos elétricos que serão transmitidos até o sistema nervoso central e interpretados no córtex cerebral como dor (MIYAKE; REIS; GRISI, 1998; PRADO, 2001; ROCHA et al., 2007).

Em condições normais, a informação sensorial é captada pelas estruturas do sistema nervoso periférico (SNP) e transmitida para unidades do SNC, onde é decodificada e interpretada (TEIXEIRA, 2001). Estes sinais elétricos são conduzidos através dos dois tipos de fibras nervosas (A $\delta$  e C) até o corno dorsal da coluna espinhal, onde realizam sinapses com interneurônios medulares, podendo ser modulados por peptídeos opioides. Da medula espinhal, os estímulos dolorosos percorrem os tratos espinotalâmicos e espinorreticulares, alcançando estruturas nervosas centrais (formação reticular, tálamo, sistema límbico, córtex cerebral), onde são modulados novamente via receptores opioides. A interpretação do estímulo doloroso é individual e sofre influência dos padrões culturais, do grau de medo e ansiedade e das experiências dolorosas prévias. A partir dessa percepção da dor pelo SNC, são obtidas as respostas motoras, autonômicas e comportamentais diante do estímulo doloroso. A dor desencadeia, então, uma série de respostas neuroendócrinas e cardiovasculares com o objetivo de preparar o organismo contra a agressão, em um tipo de resposta de “luta ou fuga” (KIDD; URBAN, 2001; MIYAKE; REIS; GRISI, 1998; PRADO, 2001).

### **3.6.3 Tratamento da dor**

O tratamento das dores aguda e crônica é multimodal e envolve o uso de intervenções farmacológicas, psíquicas, físicas, a utilização de bloqueios anestésicos regionais e métodos neurocirúrgicos (KRAYCHETE, 2002).

Várias classes de fármacos são utilizadas na prevenção e no tratamento da dor, dependendo da intensidade, duração e da natureza do estímulo doloroso. Dentre estes podemos citar: os AINEs (aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, AAS, etc.), os opioides e um grupo de medicamentos adjuvantes, tais como antidepressivos, anticonvulsivos e analgésicos

locais (CARVALHO; CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004; GIUBLIN, 2002; MIYAKE; REIS; GRISI, 1998; SAWYNOK, 2003; TEIXEIRA; VALLE, 2001).

Os *AINEs* produzem analgesia por meio do bloqueio periférico da produção de prostaglandinas. São as drogas mais comumente utilizadas no controle da dor devido à baixa toxicidade, efeitos cardiovasculares e respiratórios raros, exceto em situações de envenenamento. Porém, seu efeito analgésico é limitado, sendo ineficazes em algumas situações, como no caso das dores neuropáticas, nas quais analgésicos mais potentes devem ser utilizados. Os AINEs apresentam, também, ação antipirética e são desprovidos de efeitos sedativos (CARVALHO; CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004; LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000; MIYAKE; REIS; GRISI, 1998; RIBEIRO; SCHMIDT; SCHMIDT, 2002).

Os *analgésicos opioides* (codeína, morfina, meperidina, etc), derivados do ópio, são usados em analgesia há séculos. Seus efeitos neurológicos incluem sedação e sonolência, porém podem causar, também, euforia, agitação, tremores e até convulsões. A ação nos receptores opioides determina o mecanismo de ação, as propriedades clínicas e os efeitos adversos. São conhecidos diversos tipos de receptores opiáceos:  $\mu$  (mu 1 e 2),  $\kappa$  (kappa),  $\delta$  (delta) e  $\sigma$  (sigma), sendo os receptores  $\mu$  e  $\kappa$  responsáveis pela analgesia supra-espinhal e espinhal. A ocupação destes receptores por este tipo de analgésico reforça a ação fisiológica das endorfinas e a das vias inibitórias noradrenérgicas e serotoninérgicas. Inibem, ainda, a liberação de neuromediadores da dor, como a substância P, e hiperpolarizam os neurônios aferentes do corno posterior da medula. Contudo, apresentam vários efeitos colaterais, entre eles, sedação, náusea, vômitos, prurido, retenção urinária e constipação intestinal numa relação dose-dependente, além da dependência química (BASSANEZI; OLIVEIRA-FILHO, 2006; LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000; MIYAKE; REIS; GRISI, 1998).

Os *anestésicos locais* atuam tanto pelo bloqueio dos canais de sódio, o que impede a transmissão de impulsos nervosos e excitação nociceptora, como pela inibição do processamento nociceptivo modulatório quando administrado centralmente. Já os *anestésicos gerais* não são, exatamente, analgésicos. Estes, no entanto, inibem a percepção da dor, tornando o córtex incapaz de perceber a entrada da informação nociceptiva, pois leva à inconsciência (BASSANEZI; OLIVEIRA-FILHO, 2006; LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000).

Lectinas também têm sido amplamente investigadas quanto à sua atividade antinociceptiva. A lectina CcL, isolada da alga marinha *Caulerpa cupressoides*, foi investigada através de modelos clássicos de nocicepção e demonstrou ser um composto antinociceptivo, agindo predominantemente em mecanismos periféricos da dor

(VANDERLEI et al., 2010). Pires et al. (2011), investigando as propriedades nociceptivas da lectina ConBr, descobriram que quando administrada por via oral a camundongos Swiss, a mesma exibiu atividade antinociceptiva periférica e central, mediada pelo sistema opioide e envolvendo os receptores  $\delta$  e  $\kappa$  e os domínios de lectina. CrataBL, uma lectina obtida da entrecasca de *Crataeva tapia*, também apresentou ação antinociceptiva em camundongos albinos Swiss no modelo de nocicepção induzida por ácido acético (ARAÚJO et al., 2011).

### 3.7 *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz

#### 3.7.1 Descrição botânica e importância econômica da espécie

*Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz, cuja sinonímia botânica é *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*, é uma árvore que pertence à família Leguminosae-Caesalpinioideae (Caesalpinaceae) e que cresce em todo o Brasil (BRAGANÇA, 1996; LORENZI, 2002), sendo largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste, principalmente em Pernambuco e no Ceará (ALZUGARAY, 1984). Em Pernambuco acha-se predominantemente nas áreas pobres da Região do São Francisco e nos municípios de Floresta e de Buíque. É conhecida vulgarmente como pau-ferro ou jucá; além dos nomes indígenas ibirá-obi, imirá-itá, muirá-obi e muirá-itá (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; LORENZI, 2002).

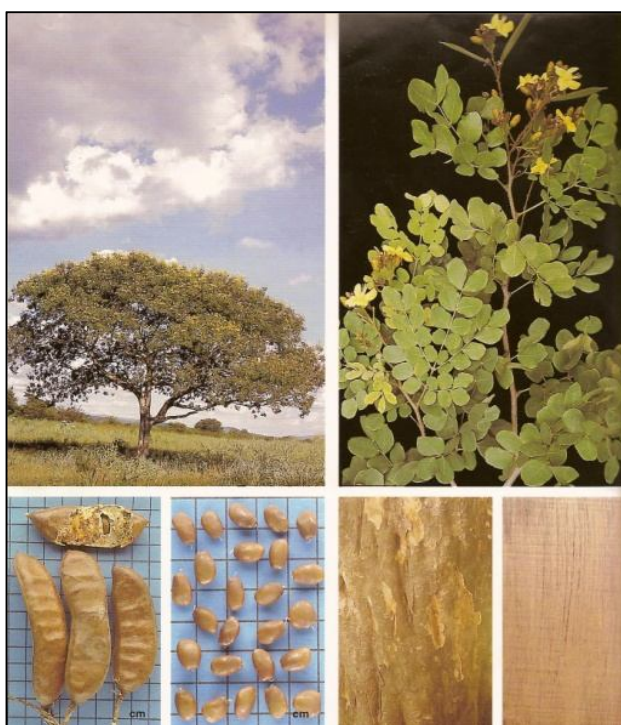
Possui flores amarelas pequenas e em cachos; frutos de cor marrom escura, lisos, duros e aromáticos do tipo legume (vagem), com sementes também escuras; folhas compostas, com folíolos pequenos; altura de 10-15 m, com tronco curto de 40-60 cm de diâmetro apresentando manchas claras, características que permitem seu fácil reconhecimento (**Figura 16**) (RIZZINI, 1995). Floresce a partir de novembro, prolongando-se até janeiro. Os frutos amadurecem em julho-agosto (LORENZI, 2002).

É uma espécie economicamente importante, devido a uma multiplicidade de usos: possui grande potencial medicinal; é bastante ornamental, podendo ser empregada na arborização de ruas e avenidas e aproveitada para plantios em áreas degradadas; além de sua madeira de cerne muito duro, de fibras reversas, característica que dá origem ao nome popular da espécie, ser utilizada na construção civil (como vigas, esteios, estacas), como lenha e na carpintaria (LORENZI, 2002; PENNA, 1946; PIO CORRÊA, 1984). Além disso, o pau-ferro é considerado uma forrageira importante no Nordeste, tanto pela sua adaptação natural à região, como também por fornecer forragem durante a seca (NASCIMENTO et al., 2002).

### 3.7.2 Propriedades terapêuticas

A espécie *L. ferrea* é bastante conhecida na medicina popular, sendo suas diferentes partes utilizadas no tratamento de várias doenças e sintomas. Em face de sua importância etnomédica, o Ministério da Saúde brasileiro incluiu esta espécie na Lista Nacional de Plantas Medicinais importantes para o Sistema de Saúde (VASCONCELOS et al., 2011).

**Figura 16** – Aspectos gerais da árvore, folhas, flores, frutos, sementes e madeira de *Libidibia* (*Caesalpinia*) *ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz.



Fonte: LORENZI (2002).

Muitas de suas propriedades terapêuticas têm sido descritas, e incluem tratamento de ferimentos e contusões, alívio de tosse crônica e asma (BRAGA, 1976; HASHIMOTO, 1996). Além disso, algumas pesquisas mostram que o jucá possui ação antifúngica e antibacteriana (LIMA et al., 1994; SAMPAIO et al., 2009; XIMENES, 2004), antiulcerogênica (BACCHI et al., 1995; BACCHI; SERTIE, 1994) e anti-inflamatória; bem como propriedades analgésicas (CARVALHO et al., 1996; FREITAS et al., 2012; THOMAS; ARAÚJO; SOUZA, 1988) e anti-hipertensivas (MENEZES et al., 2007).

Na medicina popular, o chá da entrecasca de *L. ferrea* tem sido usado no tratamento de diabetes (ARAÚJO; ALENCAR; AMORIM, 2008). A casca também é usada como

descongestionante, no tratamento da enterocolite, diarreia (BALBACH, 1972), e contra reumatismo (BRAGANÇA, 1996; GOMES, 2003), mostrando ainda possíveis benefícios no sistema cardiovascular dos usuários (MENEZES et al., 2007). A decocção da madeira é anticatarral e cicatrizante e suas raízes são utilizadas como antipiréticas e antidiarreicas (LEWIS, 1987; PENNA, 1964; PIO CORRÊA, 1984).

O preparado da casca com um litro de água e um quilo de açúcar, aquecido até formar um xarope, é utilizado contra asma e bronquite. A infusão conjunta da raspa da casca com folhas de manga é útil como antigripal e antitussígeno, ao passo que o preparado de casca de jucá, casca de jatobá, folhas de manga, açúcar e água, após aquecimento, é utilizado como anticatarral (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Na região da Mata Atlântica, a infusão das folhas é usada contra problemas respiratórios, especialmente bronquites, além do uso comum contra gripes, resfriados e tosses. Na região amazônica, suas folhas, na forma de decocto, são utilizadas externamente e no local contra hemorroidas, enquanto o uso interno dessa decocção é indicado contra amebíase e problemas hepáticos, além de ser empregado como fortificante para crianças. O sumo das folhas é usado internamente para problemas cardíacos. A infusão conjunta das folhas e frutos é útil para tratar inflamações do fígado e tuberculose, enquanto a decocção da casca é usada internamente como antidisentérico (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Os frutos têm sido usados também no tratamento de diabetes (BALBACH, 1972) – inclusive um composto isolado do fruto foi o ácido elágico, inibidor da aldose redutase, a qual é uma enzima envolvida nas complicações do diabetes sugerindo o efeito antidiabético (UEDA et al., 2001) – e na prevenção do câncer (NAKAMURA et al., 2002a; NOZAKI et al., 2007). Os constituintes extraídos dos extratos alcoólicos já foram avaliados *in vitro* e *in vivo* quanto ao seu efeito antitumoral e quimiopreventivo, utilizando o ensaio de ativação do antígeno do vírus Epstein-Barr e processos carcinogênicos de pele, no segundo estágio, respectivamente (NAKAMURA et al., 2002a; NAKAMURA et al., 2002b).

Habitantes da floresta amazônica usam esta planta também como enxaguatório bucal, macerando os frutos em álcool por dias (BORRÁS, 2003; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; VIEIRA, 1992). A tintura alcoólica pode ser preparada colocando o pó dos frutos secos (100-300 g) em álcool (70%) por 8 dias (LORENZI; MATOS, 2002). Um medicamento de cura também pode ser preparado com os frutos frescos (500 g) e 100 mL de álcool puro. A infusão dos frutos é recomendada para o tratamento de feridas orais e controle de problemas gástricos (CAVALCANTE, 2008). A vagem crua é útil contra tosse, inflamações do fígado e baço, bem

como contra desarranjo menstrual e problemas renais e pulmonares (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

No Piauí, a espécie também é utilizada contra feridas e contusões (EMPERAIRE, 1982), e em Alagoas, contra tosse crônica, asma e como cicatrizante (CAMPÊLO, 1982).

Um estudo fitoquímico preliminar do extrato hidroalcoólico da casca do caule e das folhas demonstrou a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos (GONZALEZ; BARROS; BACCHI, 2004). Taninos foram os principais compostos encontrados (SOUZA et al., 2006).

O extrato aquoso de *C. ferrea* mostrou-se, ainda, eficaz no estímulo da mielopoiese frente à listeriose e tumor ascítico de Ehrlich em ratos, promovendo certa proteção contra dose letal de *Listeria monocytogenes* e aumentando a sobrevivência dos animais, respectivamente (QUEIROZ et al., 2001).

Outras plantas do gênero *Caesalpinia* L. que são usadas para inflamações na garganta e infecções orais possuem propriedades antibacterianas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SAEED; SABIR, 2001; SUDHAKAR et al., 2006), inclusive a ação antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* pode ser devida aos polifenóis presentes, já que os mesmos são mediadores na membrana celular e fosforilação oxidativa em baixas concentrações (KAKIUCHI et al., 1986; SCALBERT; JOHNSON; SALTMARSH, 2005). Contudo, apenas recentemente, os polifenóis presentes nos frutos e folhas têm sido pesquisados com relação aos seus efeitos sobre microorganismos em biofilmes (DUARTE et al., 2006; HUBER et al., 2003; PERCIVAL et al., 2006).

A utilização e a comercialização de extratos aquosos e alcoólicos, farinha de diversos tecidos e da vagem de *C. ferrea* para aplicações na medicina popular desperta o interesse desta planta para estudos biotecnológicos (XIMENES, 2004). Lectinas com atividades antimicrobianas dos diferentes tecidos (vagem, folha e entrecasca) de *L. ferrea* já foram purificadas no Laboratório de Glicoproteínas – CCB/UFPE. As amostras lectínicas mostraram sua pureza, não sendo observados contaminantes do metabolismo secundário.



## REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; CARRETERO, E.; MARTÍNEZ-ACITORES, C.; NOGUERA, B.; VILLAR, A. Anti-inflammatory activity of some medicinal plant extracts from Venezuela. **Journal of Ethnopharmacology**, 55, pp 63-68, 1996.
- ABDU, F. B. Neuronal activation and plasticity in *Schistosoma mansoni* infected mice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 19, pp. 495-501, 2012.
- ABDU, S. B. *Schistosoma mansoni* induce granulomatous inflammation and lesion to the enteric nervous system in mouse colon. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, 39, pp. 183-190, 2009.
- ABDULLAEV, F. I.; MEJIA, E. G. Antitumor effect of plant lectins. **Natural Toxins**, v. 5(4), pp. 157-163, 1997.
- ABROGOUA, D. P.; DANO, D. S.; MANDA, P.; ADEPO, A. J. B.; KABLANA, B. J.; GOZE, N. B.; EHOULÉ, K. Effect on blood pressure of a dietary supplement containing traditional medicinal plants of Côte d'Ivoire. **Journal of Ethnopharmacology**, 141, pp. 840-847, 2012.
- ADEBAYO, J. O.; KRETTLI, A. U. Potential antimalarials from Nigerian plants: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, 133, pp. 289-302, 2011.
- AGGARWAL, B. B. Nuclear factor- $\kappa$ B: The enemy within. **Cancer Cell**, v. 6, pp. 203-208, 2004.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: ARTMED, 1999. 757 p.
- ALBINI, A.; SPORN, M. B. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. **Nature Reviews Cancer**, 7, pp. 139-147, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, 2006.
- ALEXIOU, C.; ARNOLD, W.; KLEIN, R. J.; PARAK, F. G.; HULIN, P.; BERGEMANN, C.; ERHARDT, W.; WAGENPFEIL, S.; A. S. LÜBBE. Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting. **Cancer Research**, 60, pp. 6641-6648, 2000.
- ALPUCHE, J.; PEREYRA, A.; AGUNDIS, C.; ROSAS, C.; PASCUAL, C.; SLOMIANNY, M. C.; VÁZQUEZ, L.; ZENTENO, E. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea-Decapoda) hemolymph. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, pp. 86-93, 2005.
- ALVES, T. M. D.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 95, pp. 367-373, 2000.

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

AMANTEA, D.; NAPPI, G.; BERNARDI, G.; BAGETTA, G.; CORASANITI, M. T. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. **FEBS Journal**, 276, pp. 13-26, 2009.

ANDERSON, J. E.; GOETZ, C. M.; MCLAUGHLIN, J. L.; SUFFINESS, M. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor pre-screens. **Phytochemical Analysis**, 2, pp. 107-111, 1991.

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, pp. 435-445, 2004.

ANTUNES, R. V.; COELHO, L. C. B. B. Identification of lectin activity in the hemolymph of *Castnia licus* drury, a sugar-cane giant borer (Lepidoptera-Castniidae). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, pp. 33-37, 1993.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, Issue 1, pp. 17-25, 2007.

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**, 1, pp. 97-100, 2011.

ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, 120, pp. 72-80, 2008.

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

ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; DE SOUZA, M. L. P.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, 6(3), pp. 201-210, 1997.

AUDETTE, G. F.; VANDONSELOAR, M.; DELBAERE, L. TL J. The 2.2 Å resolution structure of the O (H) blood-specific lectin I from *Ulex europaeus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 304, p. 423 – 433, 2000.

AWAH, F. M.; UZOEGWU, P. N.; IFEONU, P.; OYUGI, J. O.; RUTHERFORD, J.; YAO, X. J.; FEHRMANN, F.; FOWKE, K. R.; EZE, M. O. Free radical scavenging activity, phenolic contents and cytotoxicity of selected Nigerian medicinal plants. **Food Chemistry**, 131, pp. 1279-1286, 2012.

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

- BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Anti-ulceration and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, 61, p. 204-207, 1995.
- BALBACH, A. **As plantas que curam**. São Paulo: Três, 1972, p. 302-303.
- BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, v. 7, pp. 211-217, 2005.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, 78, pp. 431-441, 2005.
- BANERJEE, S.; CHAKI, S.; BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B. P. Mucin binding mitogenic from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 421, pp. 125 - 134, 2004.
- BANIYASH, M. Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: new insights and outlook. **Seminars in Cancer Biology**, 16, pp. 80-88, 2006.
- BARAHONA, M. V.; SANCHEZ-FORTUN, S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environmental Pollution**, 104, pp. 469-76, 1999.
- BARAHONA, M. V.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Protective effect induced by atropine, carbamates, and 2-pyridine aldoxime methoiodide *Artemia salina* larvae exposed to fonofos and phosphamidon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, pp. 65-73, 2007.
- BASSANEZI, B. S. B.; OLIVEIRA FILHO, A. G. Analgesia pós-operatória. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 2, p. 116-122, 2006.
- BENNETT, M. I.; RAYMENT, C.; HJERMSTAD, M.; AASS, N.; CARACENI, A.; KAASA, S. Prevalence and aetiology of neuropathic pain in cancer patients: A systematic review. **Pain**, 153(2), pp. 359-365, 2012.
- BERNARDS, R.; WEINBERG, R. A. A progression puzzle – metastasis genes. **Nature**, v. 418, p. 823, 2002.
- BILIA, A. R.; NIERI, E.; BRACA, A.; MORELLI, I. Screening of Mediterranean Rosaceae plants for their molluscicidal and piscicidal activities. **Phytotherapy Research**, 14, pp. 126-129, 2000.
- BLOEMEN, K.; VERSTRAELEN, S.; VAN DEN HEUVEL, R.; WITTERS, H.; NELISSEN, I.; SCHOETERS, G. The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. **Immunology Letters**, 113, pp. 6-18, 2007.
- BONICA, J.; VENTAFRIDA, V.; TWYXCROSS, R. G. Cancer Pain. In: BONICA, J. **The Management of Pain**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. pp. 400-460.

- BORRÁS, M. R. L. **Plantas da Amazônia: Medicinais ou mágicas? Plantas comercializadas no mercado Adolpho Lisboa**. Manaus: Editora Valer/Governo do Estado do Amazonas, 2003. 322 p.
- BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Antigenic relations of blood group antigen as suggested by test with lectins. **Immunology**, 73, p. 226, 1954.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2. ed. São Paulo: Três, 1976. p. 45-56.
- BRAGANÇA, L. A. R. **Plantas Medicinais Antidiabéticas**. Niterói: EDUFF Press, 1996. p. 172.
- BRANCO, A. T.; BERNABÉ, R. B.; FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, M. V. V.; GARCIA, A. B.; SOUZA-FILHO, G. A. Expression and purification recombinant SALT lectin from rice (*Oryza sativa* L.). **Protein expression & Purification**, 33, pp. 34-38, 2004.
- BROEKAERT, W. F.; PARIJS, J. V.; LEYNS, F.; JOOS, H.; PEUMANS, W. J. A Chitin-Binding Lectin from Stinging Nettle Rhizomes with Antifungal Properties. **Science**, v. 245, n. 4922, pp. 1100-1102, 1989.
- BROMBERG, J.; WANG, T. C. Inflammation and Cancer: IL-6 and STAT3 Complete the Link. **Cancer Cell**, 15, pp. 79-80, 2009.
- BROOKER, S.; BETHONY, J.; HOTEZ, P. J. Human hookworm infection in the 21st century. **Advances in Parasitology**, 58, pp. 197-288, 2004.
- CALDWELL, G. S.; BENTLEY, M. G.; OLIVE, P. J. W. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. **Toxicon**, v. 42, pp. 301-306, 2003.
- CAMPÊLO, C. R. **Oréades**, v. 8, n. 14/14, p. 82-88, 1982.
- CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, 40, pp. 1515-1539, 2002.
- CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 131, pp. 326-342, 2010.
- CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; DOS SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 53, pp. 175-178, 1996.
- CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 54(3), pp. 448-464, 2004.

CANTANHEDE, S. P. D.; MARQUES, A. M.; SILVA-SOUZA, N.; VALVERDE, A. L. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. **Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 20(2), pp. 282-288, 2010.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, 23(1), pp. 20-22, 2000.

CAVALCANTE, R. **As plantas medicinais na Odontologia: um guia prático**. 2. ed. Rio Branco: Expressão Gráfica, 2008. 264 p.

CERQUEIRA, E. M. M. Câncer e Genética. In: BARACAT, F. F.; FERNANDES JR., H. J.; SILVA, M. J. **Cancerologia Atual: Um Enfoque Multidisciplinar**. São Paulo: Roca, 2000. pp. 507-515.

CHANG, Y. H.; LEE, S. T.; LIN, W. W. Effects of cannabinoids on LPSstimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. **Journal of Cellular Biochemistry**, 81, pp. 715-723, 2001.

CHEN, J.; LIU, B.; JI, N.; ZHOU, J.; BIAN, H.; LI, C.; CHEN, F.; BAO, J. A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. **Phytomedicine**, 16, pp. 352-360, 2009.

CHETTIBI, S.; FERGUSON, M. W. J. Wound repair: an overview. In: GALLIN, J. I.; SNYDERMAN, R. (eds). **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. Philadelphia: Lipincott, Williams & Wilkinson, 1999. pp. 865-881.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, 77, pp. 41-51, 2000.

COELHO, J. S.; SANTOS, N. D. L.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; FERREIRA, R. S.; ZINGALI, R. B.; COELHO, L. C. B. B.; LEITE, S. P.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, 77, pp. 934-938, 2009.

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

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination**. COLEGATE, S. M. (Ed.). London: CRC Press, 1993. p. 441.

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, pp. 715-721, 2002.

CORRÊA; J. M.; PENAFORT, J. M. Considerações sobre biologia e utilização de *Artemia* sp. (CRUSTACEA: BRANCHIOPODA: ANOSTRACA) – considerations about biology and use

of *Artemia* sp. (CRUSTACEA: BRANCHIOPODA: ANOSTRACA). **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 12, n. 12, 2011.

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

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic? In: SIDDIQUE, Y. H. (Ed.), (Org.). **Recent Trends in Toxicology**, vol. 37, Transworld Research Network, Kerala, 2008, pp. 47-59.

COSSERMELLI, W.; PASTOR, E. H. Anti-inflamatórios não-esteroides e doenças reumatológicas. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, 50, p. 115-124, 1995.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, 420, pp. 860-867, 2002.

COX, P. A. The ethnobotanical approach to drug discovery: strengths and limitations. **CIBA Foundation Symposium**, 185, pp. 25-41, 1994.

CRONSTEIN, B. N.; WEISSMANN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 2, pp. 147-157, 1993.

DAMICO, D. C. S.; FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, M. L. R. Isolation and characterization of a lectin from *Annona muricata* seeds. **Journal of Protein Chemistry**, 22, pp. 655-661, 2003.

DAUDT, A. W.; HADLICH, E.; FACIN, M. A.; APRATO, R. M. S.; PEREIRA, R. P. Opioides no manejo da dor – uso correto ou subestimado? Dados de um hospital universitário. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 44(2), pp. 106-110, 1998.

DEEPA, M.; SURESHKUMAR, T.; SATHEESHKUMAR, P. K.; PRIYA, S. Purified mulberry leaf lectin (MLL) induces apoptosis and cell cycle arrest in human breast cancer and colon cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, 2012. *Article in Press*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2012.08.025>.

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

DESCH, C. E. Etiologia do câncer: oncogenes e fatores ambientais/tóxicos. In: ANDREOLI, T. E.; CARPENTER, C. C. J.; GRIGGS, R. C.; LOSCALZO, J. **Cecil Medicina Interna Básica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 436-438.

DEY, A.; DE, J. N. Ethnobotanical survey of Purulia district, West Bengal, India for medicinal plants used against gastrointestinal disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, 143, pp. 68-80, 2012.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Unesp, 2002. 604 p.

DÍAZ, P. H.; GONZÁLEZ, O. M.; VÉLEZ, Y. R. P.; BÁEZ, C. F. A. G. Aplicaciones de las lectinas. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, 15(2), pp. 91-95, 1999.

DINARELLO, C. A. Grand challenge in inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, article 12, p. 1, 2012.

DJOUHRI, L.; FANG, X.; KOUTSIKOU, S.; LAWSON, S. N. Partial nerve injury induces electrophysiological changes in conducting (uninjured) nociceptive and nonnociceptive DRG neurons: Possible relationships to aspects of peripheral neuropathic pain and paresthesias. **Pain**, 153, pp. 1824-1836, 2012.

DOES, M. P.; HOUTERMAN, P. M.; DEKKER, H. L.; CORNELISSEN, B. J. C. Processing, targeting and antifungal activity of stinging nettle agglutinin in transgenic tobacco. **Plant Physiology**, v. 120(2), pp. 421-431, 1999.

DOS SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. The molluscicidal activity of plants used in Brazilian folk medicine. **Phytomedicine**, 6(6), pp. 431-438, 2000.

DROST, J.; AGAMI, R. Transformation Locked in a Loop. **Cell**, 139, pp. 654-656, 2009.

DUARTE, S.; GREGOIRE, S.; SINGH, A. P.; VORSA, N.; SCHAICH, K.; BOWEN, W. H.; KOO, H. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, 257, pp. 50-56, 2006.

DUNPHY, J. L.; BARCHAM, G. J.; BISCHOF, R. J.; YOUNG, A. R.; NASH, A.; MEEUSEN, E. N. T. Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, pp. 14916-14924, 2002.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, pp. 462-467, 1997.

ELKARADAWY, S.; NASR, M.; ELKERM, Y.; DEEB, M. E.; YASSINE, O. The effect of multimodal balanced anaesthesia and long term gabapentin on neuropathic pain, nitric oxide and interleukin-1 $\beta$  following breast surgery. **Egyptian Journal of Anaesthesia**, 28, pp. 67-78, 2012.

EMPERAIRE, L. **Oréades**, v. 8, n. 14/15, p.61-71, 1982.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109(1), pp. 69-75, 2001.

FANG, E. F.; ZHANG, C. Z. Y.; NG, T. B.; WONG, J. H.; PAN, W. L.; YE, X. J.; CHAN, Y. S.; FONG, W. P. *Momordica charantia* Lectin, a Type II Ribosome Inactivating Protein,

Exhibits Antitumor Activity toward Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells *In Vitro* and *In Vivo*. **Cancer Prevention Research**, 5, pp. 109-121, 2012.

FARNSWORTH, N. R. The role of medicinal plants in drug development. In: KROGSGAARD-LARSEN, P.; CHRISTENSEN, S. B.; KOFOD, H. (eds). **Natural Products and Drug Development**. Balliere, Tindall, and Cox, London, 1984, pp. 8-98.

FENG, K.; LIU, Q. H.; NG, T. B.; LIU, H. Z.; LI, J. Q.; CHEN, G.; SHENG, H. Y.; XIE, Z. L.; WANG, H. X. Isolation and characterization of a novel lectin from the mushroom *Armillaria luteo-virens*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, pp. 1573-1578, 2006.

FENTON-NAVARRO, B.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, E.; HEIMER, E.; AGUILAR, M. B.; RODRÍGUEZ, A. C.; ARREGUÍN-ESPINOSA, R.; FALCÓN, A. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antilliensis*. **Toxicon**, 42(5), pp. 525-532, 2003.

FERNANDES JÚNIOR, H. J. Introdução ao estudo das neoplasias. In: BARACAT, F. F.; FERNANDES JR., H. J.; SILVA, M. J. **Cancerologia Atual: Um Enfoque Multidisciplinar**. São Paulo: Roca, 2000. pp. 3-10.

FERREIRA, M. B. C.; TORRES, I. L. S. Dor crônica. In: KAPCZINSKY, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos**. 2. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2004. pp. 347-365.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature Reviews / Cancer**, v. 3, pp. 1-6, 2003.

FISCH, M. J.; LEE, J. W.; WEISS, M.; WAGNER, L. I.; CHANG, V. T.; CELLA, D.; MANOLA, J. B.; MINASIAN, L. M.; MCCASKILL-STEVENS, W.; MENDOZA, T. R.; CLEELAND, C. S. Prospective, Observational Study of Pain and Analgesic Prescribing in Medical Oncology Outpatients With Breast, Colorectal, Lung, or Prostate Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 16, pp. 1980-1988, 2012.

FREDMAN, G.; SERHAN, C. N. Specialized Pro-resolving Lipid Derived Acid Mediators: Wiring the Circuitry of Effector Immune Homeostasis. Cap. 4, pp. 57-80. In: LARJAVA, H. (ed.). **Oral Wound Healing: Cell Biology and Clinical Management**. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2012. 413 p.

FREIRE, M. G. **Isolamento, caracterização físico-química e estudo das atividades inseticida, microbicida e inflamatória da lectina de sementes de *Talisia esculenta* (ST. HILL) RALDLAK**. Campinas: 2003. (Tese para obtenção do título de Doutor em Bioquímica – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas). 189 p.

FREITAS, A. C. C.; XIMENES, N. C. A.; AGUIAR, J. S.; NASCIMENTO, S. C.; LINS, T. U. L.; MAGALHÃES, L. R.; COELHO, L. C. B. B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; GONÇALVES-SILVA, T.; CORREIA, M. T. S. Biological Activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, Article ID 514134, doi:10.1155/2012/514134, 7 pages, 2012.



- 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, pp. 35-47, 2001.
- GAIDAMASHVILI, M.; VAN STANDEN, J. Interactin of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, pp. 131-135, 2002.
- GAIDAMASHVILI, M.; VAN STADEN, J. Prostaglandin inhibitory activity by lectin-like proteins from South African medicinal plants. **South African Journal of Botany**, 72, pp. 661-663, 2006.
- GAUTAM, R.; SAKLANI, A.; JACHAK, S. M. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. **Journal of Ethnopharmacology**, 110, pp. 200-234, 2007.
- GERLACH, D.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U.; SCHMIDT, K. H. N-acetyl-D-galactosamine/N-acetyl-D-glucosamine – recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 43, pp. 223-232, 2005.
- GHASI, S.; NWOBODO, E.; OFILI, J. O. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, Issue 1, pp. 21-25, 2000.
- GIUBLIN, M. L. Tratamento Farmacológico. In: CONSENSO NACIONAL DE DOR ONCOLÓGICA, 1., 2002, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Editora de Projetos Médicos, pp. 51-65, 2002.
- GLENNON, R. A.; DUKAT, M. Serotonin receptors and drugs afeting serotonergic neurotransmission. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5. ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 315-337.
- GOMES, M. **As plantas da saúde – guia de tratamentos naturais**. 3. ed. São Paulo: Paulinas, 2003. p. 232.
- GOMES, B. S.; SIQUEIRA, A. B. S.; MAIA, R. C. C.; GIAMPAOLI, V.; TEIXEIRA, E. H.; ARRUDA, F. V. S.; NASCIMENTO, K. S.; LIMA, A. N.; SOUZA-MOTTA, C. M.; CAVADA, B. S.; PORTO, A. L. F. Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, pp. 770-778, 2012.
- GONDA, T. A.; TU, S.; WANG, T. C. Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. **Cell Cycle**, 8, pp. 2005-2013, 2009.
- GONZALEZ, F. G.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. In: IX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 2004, São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2004. v. 40, p. 79.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N.; BADILLO-CORONA, J. A.; ARANDA-BARRADAS, J. S.; OLIVER-SALVADOR, M. C. Production of plant proteases in vivo and in vitro - A review. **Biotechnology Advances**, 29, pp. 983-996, 2011.

GRIVENNIKOV, S.; KARIN, M. Autocrine IL-6 Signaling: A Key Event in Tumorigenesis? **Cancer Cell**, 13, pp. 7-9, 2008.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, 140, pp. 883-899, 2010.

GRUBHOFFER, L.; HYPISA, V.; VOLF, P. Lectins (hemagglutinins) in the gut of the important disease vectors. **Parasitology**, v. 4, pp. 203-16, 1997.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; KUMAR, R. S.; SIVAKUMAR, T.; VAMSI, M. L. M. Antitumor Activity and Antioxidant Status of *Caesalpinia bonducella* Against Ehrlich Ascites Carcinoma in Swiss Albino Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 94, pp. 177-184, 2004.

HAIJIE, Y.; LUO, H.; LI, F.; LI, S.; XU, X. Purification and characterisation of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, 22, pp. 88-97, 2007.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 13, pp. 413-421, 2002.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100, pp. 57-70, 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144(5), pp. 646-674, 2011.

HANSEL, D. E.; DINTZIS, R. Z. **Fundamentos de Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 937 p.

HANSON, G. R. Analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios. In: GENNARO, A. R. (editor). **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1502-1521.

HARTMUT, F. **Advances in lectin research**. v. 1. Berlin: Spring-Verlag, 1988.

HARWIG, J., SCOTT, P. M. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. **Applied Microbiology**, 21, pp. 1011-1016, 1971.

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

HENNINGS, H.; GLICK, A. B.; GREENHALGH, D. A.; MORGAN, D. L.; STRICKLAND, J. E.; TENNENBAUM, T.; YUSPA, S. H. Critical aspects of initiation, promotion, and progression in multistage epidermal carcinogenesis. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 202, pp. 1-8. 1993.

HERBERT, D. R.; OREKOV, T.; ROLOSON, A.; ILIES, M.; PERKINS, C.; O'BRIEN, W.; CEDERBAUM, S.; CHRISTIANSON, D. W.; ZIMMERMANN, N.; ROTHENBERG, M. E.; FINKELMAN, F. D. Arginase I suppresses IL-12/IL-23p40-driven intestinal inflammation during acute schistosomiasis. **Journal of Immunology**, 184, pp. 6438-6446, 2010.

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

HIRSCH, H. A.; ILIOPOULOS, D.; JOSHI, A.; ZHANG, Y.; JAEGER, S. A.; BULYK, M.; TSICHLIS, P. N.; LIU, X. S.; STRUHL, K. A Transcriptional Signature and Common Gene Networks Link Cancer with Lipid Metabolism and Diverse Human Diseases. **Cancer Cell**, 17, pp. 348-361, 2010.

HOFFMANN, A.; XIA, Y.; VERMA, I. M. Inflammatory Tales of Liver Cancer. **Cancer Cell**, 11, pp. 99-101, 2007.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97, pp. 1027-1031, 2002.

HONG, M.; CASSELY, A.; MECHREF, Y.; NOVOTNY, M. V. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 752, pp. 207-216, 2001.

HOPKINS, T. L.; HARPER, M. S. Lepidopteran peritrophic membranes and the effect of dietary germ agglutinin on their formation and structure. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 47, pp. 100-109, 2001.

HOUGHTON, A. N.; UCHI, H.; WOLCHOK, J. D. The role of the immune system in early epithelial carcinogenesis: B-ware the double-edged sword. **Cancer Cell**, v. 7, pp. 403-405, 2005.

HOUGHTON, P. J. Old yet new-pharmaceuticals from plants. **Journal of Chemical Education**, 78, pp. 175-184. 2001.

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

HSU, W. J.; CHICHESTER, C. O.; DAVIES, B. H. The metabolism of  $\beta$ -carotene and other carotenoids in the brine shrimp, *Artemia salina* L. (Crustacea: Branchiopoda). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 32, pp. 69-79, 1970.

<<http://biologiaacontecendo.blogspot.com.br/2012/04/artemia-salina.html>>. Acesso em: 13 de setembro de 2012.

<[http://www.cre6-rjrj.blogspot.com.br/2012\\_06\\_13\\_archive.html](http://www.cre6-rjrj.blogspot.com.br/2012_06_13_archive.html)>. Acesso em: 13 de novembro de 2012.

<<http://jcgdb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t123>>. Acesso em: 10 de setembro de 2012.

<<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lect23.htm>>. Acesso em: 25 de setembro de 2012.

HUBER, B.; EBERL, L.; FEUCHT, W.; POLSTER, J. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 58, pp. 879-884, 2003.

HUNG, V. K. L.; CHEN, S. M. Y.; TAI, L. W.; CHEN, A. Y. S.; CHUNG, S. K.; CHEUNG, C. W. Over-expression of endothelin-1 in astrocytes, but not endothelial cells, ameliorates inflammatory pain response after formalin injection. **Life Sciences**, doi:10.1016/j.lfs.2012.06.038, 2012.

IGARASHI, M. A. Potencial econômico das Artemias produzidas em regiões salineiras do Rio Grande do Norte. **PUBVET**, Londrina, v. 2, n. 31, Art. 386, 2008.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 2. ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: INCA, 2012. 129 p.

JAVAN, M.; AHMADIANI, A.; SEMNANIAN, S.; KAMALINEJAD, M. Antinociceptive effects of *Trigonella foenum-graecum* leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 58, pp. 125-129, 1997.

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, pp. 1973-1982, 2005.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Cancer Statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 61, pp. 69-90, 2011.

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

KABIR, S. R.; ISLAM, M. F.; ALOM, M. J.; ABUR ZUBAIR, M.; ABSAR, N. Purification, Characterizations of a Snake Guard Seeds Lectin with Antitumor Activity Against Ehrlich Ascites Carcinoma Cells In Vivo in Mice. **Protein and Peptide Letters**, v. 19, n. 3, pp. 360-368, 2012.

KAKIUCHI, N.; HATTORI, M.; NISHIZAWA, M.; YAMAGISHI, T.; OKUDA, T.; NAMBA, T. Studies on dental caries prevention by traditional medicines. VIII. Inhibitory effect of various tannins on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, 34, pp. 720-725, 1986.

KAN, A. A.; JAGER, W.; WIT, M.; HEIJNEN, C.; ZUIDEN, M.; FERRIER, C.; RIJEN, P.; GOSSELAAR, P.; HESSEL, E.; NIEUWENHUIZEN, O.; GRAAN, P. N. E. Protein expression profiling of inflammatory mediators in human temporal lobe epilepsy reveals co-

activation of multiple chemokines and cytokines. **Journal of Neuroinflammation**, 9:207, 2012. doi:10.1186/1742-2094-9-207

KANTERMAN, J.; SADE-FELDMAN, M.; BANİYASH, M. New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression. **Seminars in Cancer Biology**, 22, pp. 307-318, 2012.

KARIN, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. **Nature**, 441, pp. 431-436, 2006.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; SAXENA, A. K.; KHAN, R. H.; ASHRAF, M. T.; KAMBOJ, S. S.; SINGH J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 445, pp. 156-165, 2006.

KAWAGISHI, H. TAKAGI, J. TAIRA, T. MURATA, T. USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, v. 56, pp. 53-58, 2001.

KEBURIA, N.; KHURTSIDZE, E.; GAIDAMASHVILI, M. Insecticidal Action of Chitin-Binding Mistletoe (*Viscum album* L.) Fruit Lectins against *Apamea sordens* Hufn. and *Pyrausta nubilalis* Hb. (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences**, v. 4, n. 3, pp. 86-88, 2010.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, 26, pp. 219-230. 1995.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, 141, pp. 52-67, 2010.

KHANH, T. D.; HONG, N. H.; XUAN, T. D.; CHUNG, I. M. Paddy weed control by medicinal and leguminous plants from Southeast Asia. **Crop Protection**, 24, pp. 421-431, 2005.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anaesthesia**, 87(1), pp. 3-11, 2001.

KING, C. H.; DANGERFIELD-CHA, M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. **Chronic Illness**, 4, pp. 65-79, 2008.

KLUG, W. S.; CUMMINGS, M. R. **Essentials of Genetics**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. pp. 431-449.

KONOZY, E. H. E.; MULAY, R.; FACA, V.; WARD, R. J.; GREENE, L. J.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SABHARWAL, S.; BHIDE, S. V. Purification, some properties of a D-galactose-binding leaf lectin from *Erythrina indica* and further characterization of seed lectin. **Biochimie**, 84 (10), pp. 1035-1043, 2002.

- KONOZY, E. H.; BERNARDES, E. S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 410(2), pp. 222-229, 2003.
- KOOLMAN, J.; ROEHM, K. H. **Color Atlas of Biochemistry**. 2. ed. Stuttgart: Thieme, 2005. 467 p.
- KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy*, 4, pp. 471-479, 2005.
- KRAYCHETE, D. Opióides. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 456-473.
- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, 89, pp. 217-233, 2011.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran / Patologia – Bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592 p.
- KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Emerging avenues linking inflammation and cancer. **Free Radical Biology & Medicine**, 52, pp. 2013-2037, 2012.
- LAKHTIN, V. M. Molecular organization of lectins (A review). **Molecular Biology Reports**, 28, pp. 157-177, 1994.
- LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 89, pp. 45-55, 2011.
- LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. Physiology of pain. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, n. 4, pp. 703-728, 2000.
- LANSKY, E. P.; PAAVILAINEN, H. M.; PAWLUS, A. D.; NEWMAN, R. A. *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. **Journal of Ethnopharmacology**, 119, pp. 195-213, 2008.
- LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, 88, pp. 85-94, 2007.
- LEE, J. B.; KATAYAMA, S. Inflammation and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: SMITH, C. M.; REYNARD, A. M. **Textbook of pharmacology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. p. 401-435.
- 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.; PESSÔA, H. L. F.; GADELHA, C. A. A.; DELATORRE, P.; CAVADA, B. S.; SANTI-GADELHA, T. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of a Lectin-Like Substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard Seeds. **Molecules**, 17, pp. 3277-3290, 2012.

LEMMICH, E.; CORNETT, C.; FURU, P.; JORSTIAN, C. L.; KNUDSEN, A. N.; OLSEN, C. E.; SALIH, A.; THILBORG, S. T. Molluscicidal saponins from *C. nilotica*. **Phytochemistry**, 39, pp. 63-68, 1995.

LEONIDAS, D. D.; SWAMY, B. M.; HATZOPOULOS, G. N.; GONCHIGAR, S. J.; CHACHADI, V. B.; INAMDAR, S. R.; ZOGRAPHOS, S. E.; OIKONOMAKOS, N. G. Structural basis for the carbohydrate recognition of the *Sclerotium rolfsii* lectin. **Journal of Molecular Biology**, v. 368, pp. 1145-1161, 2007.

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

LI, N.; GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. The Unholy Trinity: Inflammation, Cytokines, and STAT3 Shape The Cancer Microenvironment. **Cancer Cell**, 19, pp. 429-431, 2011.

LICCIARDI, P. V.; UNDERWOOD, J. R. Plant-derived medicines: A novel class of immunological adjuvants. **International Immunopharmacology**, 11, pp. 390-398, 2011.

LIEHR, J. G. Is Estradiol a Genotoxic Mutagenic Carcinogen? **Endocrine Reviews**, 21(1), pp.40-54, 2000.

LIENER, I. E.; SHATON, N.; GOLDESTINE, I. J. **The Lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine**. Orlando: Academic Press, pp. 371-435, 1986.

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

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J. P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 105, pp. 137-147, 2006.

LIMA, N. M. F.; SANTOS, A. F.; PORFÍRIO, Z.; GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G. Toxicity of lapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. **Acta Tropica**, 83, pp. 43-47, 2002.

LING, P.; NGO, K.; NGUYEN, S.; THURMOND, R. L.; EDWARDS, J. P.; KARLSSON, L.; FUNG-LEUNG, W. P. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. **British Journal of Pharmacology**, 142, pp. 161-171, 2004.

LOPES, T. C.; GONÇALVES, J. R. S.; SOUZA, N. S.; MORAES, D. F. C.; AMARAL, F. M. M.; ROSA, I. G. Avaliação moluscicida e perfil fitoquímico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. **Cad. Pesq., São Luís**, v. 18, n. 3, pp. 23-30, 2011.

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

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil, Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512 p.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1383(1), pp. 9-36. 1998.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 97, pp. 199-206, 2005.

MA, Q. H.; TIAN, B.; LI, Y. L. Overexpression of a wheat jasmonate-regulated lectin increases pathogen resistance. **Biochimie**, 92, pp. 187-193, 2010.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, 1571, pp. 83-88, 2002.

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 - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.146 (4), pp. 486-498. 2007.

MACHUKA, J. S.; OKEOLA, O. G.; VAN DAMME, E. J. M.; CHRISPEELS, M. J.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. Isolation, and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry**, 51, pp. 721-728, 1999.

MAJNO, G. **The Healing Hand: Man and Wound in the Ancient World**. Massachusetts: Harvard University Press, 1975. 573 p.

MÄKI-PETÄJÄ, K. M.; WILKINSON, I. B. Inflammation and large arteries: Potential mechanisms for inflammation-induced arterial stiffness. **Artery Research**, 6, pp. 59-64, 2012.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews / Cancer**, v. 2, pp. 143-148, 2002.

MANS, D. R. A.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. **The Oncologist**, 5, pp.185-198, 2000.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**, 454, pp. 436-444, 2008.

MARKIV, A.; PEIRIS, D.; CURLEY, G. P.; ODELL, M.; DWEK, M. V. Identification, Cloning, and Characterization of Two N-Acetylgalactosamine-binding Lectins from the



Albumen Gland of *Helix pomatia*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 23, pp. 20260-20266, 2011.

MARTINKOVA, J.; GADHER, S. J.; HAJDUCH, M.; KOVAROVA, H. Challenges in cancer research and multifaceted approaches for cancer biomarker quest. **FEBS Letters**, 583, pp. 1772-1784, 2009.

MCQUAY, H. J. Neuropathic pain: evidence matters. **European Journal of Pain**, 6 (suppl.), pp. 11-18, 2002.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C.; SMITH, D. Bench-top' bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: ATTA-UR RAHMAN (Ed.). **Studies in Natural Product Chemistry**, v. 9. London: Pergamon Press, 1991. pp. 383-389.

MEDEIROS, M. F. T.; ALBUQUERQUE, U. P. The pharmacy of the Benedictine monks: The use of medicinal plants in Northeast Brazil during the nineteenth century (1823–1829). **Journal of Ethnopharmacology**, 139, pp. 280-286, 2012.

MENDES, N. M.; VASCONCELLOS, M. C.; BAPTISTA, D. F.; ROCHA, R. S.; SCHALL, V. T. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *Hislopii* (N. E. Br.) latex: experimental test in an endemic area in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 92, pp. 719-724, 1997.

MENDELSON, J. Princípios de Neoplasia. In: ISSELBACHER, K. J.; BRAUNWALD, E.; WILSON, J. D.; MARTIN, J. B.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L. **Harrison – Medicina Interna**. 13. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1995. p. 1902-1915.

MENEZES, I. A. C.; MOREIRA, I. J. A.; CARVALHO, A. A.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R. V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, 47, pp. 41-47, 2007.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. (eds). **Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms**. 2. ed. Seattle: IASP Press, 1994.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, L.B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, 45, pp. 31-34, 1982.

MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. **Science**, 123, p. 464, 1956.

MICHIELS, K.; VAN DAMME, E. J. M.; SMAGGHE, G. Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins? **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 73, pp. 193-212, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 178 p.

MISSO, N. L.; AGGARWAL, S.; THOMPSON, P. J. Prostaglandins and Leukotrienes: Mediators of Inflammation in Asthma. Cap. 2, pp. 22-43. In: MARTIN, C. R.; PREEDY, V. R. (eds.). **Scientific Basis of Healthcare: Asthma**. New York: CRC Press, 2012. 238 p.

MIYAKE, R. S.; REIS, A. G.; GRISI, S. Sedação e analgesia em crianças. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 44(1), 56-64, 1998.

MLADENOV, I. V.; HARALAMBIEVA, I. H.; IANKO, I. D.; MITOV, I. G. Characterization of 20-kDa lectin-spermagglutinin from *Arum maculatum* that prevents *Chlamydia pneumoniae* infection of L-929 fibroblast cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 1386, pp. 1-6, 2002.

MONTECUCCO, F.; MACH, F. Common inflammatory mediators orchestrate pathophysiological processes in rheumatoid arthritis and atherosclerosis. **Rheumatology**, 48, pp. 11-22, 2009.

MOREELS, T. G.; DE MAN, J. G.; BOGERS, J. J.; DE WINTER, B. Y.; VROLIX, G.; HERMAN, A. G.; MARCK, E. A.; PELCKMANS, P. A. Effect of *Schistosoma mansoni*-induced granulomatous inflammation on murine gastrointestinal motility. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, 280, G1030-G1042, 2001.

MORRIS, J. E. Hydration, its reversibility, and the beginning of development in the brine shrimp, *Artemia salina*. **Comparative Physiology and Biochemistry**, v. 39A, pp.843-857, 1971.

MOURA, R. M.; ARAGÃO, K. S.; MELO, A. A.; CARNEIRO, R. F.; OSÓRIO, C. B. H.; LUZ, P. B.; QUEIROZ, A. F. S.; SANTOS, E. A.; ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S. *Holothuria grisea* agglutinin (HGA): the first invertebrate lectin with anti-inflammatory effects. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 2012. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2012.01073.x

NAEEM, A.; AHMAD, E.; ASHRAF, M. T.; KHAN, R. H. Purification and characterization of mannose/glucose-specific lectin from seeds of *Trigonella foenumgraecum*. **Biochemistry**, v. 72, pp. 44-48, 2007.

NAKAMURA E. L. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE JR, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, 177, p. 119-124, 2002a.

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

NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; DE SOUZA, M. A.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; ESPINDOLA, F. S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, 99, pp. 37-41, 2005.

NASCIMENTO, M. P. S. C. B.; OLIVEIRA, M. E.; MIURA, C. L. Q.; REIS, J. C. B.; NASCIMENTO, H. T. S.; LEITE, J. M. B.; LOPES, J. B.; RIBEIRO, V. Q. Potencial forrageiro do pau-ferro. In: **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 41. Teresina: Embrapa, Outubro, 2002. 16 p.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, pp. 846-852, 2002.

NELSON, W. L. Antihistamines and related antiallergic and antiulcer agents. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5. ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 794-818.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger – Principles of Biochemistry**. 4. ed. W. H. Freeman & Co., 2004. 1119 p.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 494 p.

NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, 194, pp. 23-28, 1976.

NOZAKI, H.; HAYASHI, K.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; IKEDA, S.; MATSUURA, N.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; IINUMAE, M.; AKAOF, Y. Paufferol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, 48, pp. 8290-8292, 2007.

NUNES, E. S.; SOUZA, M. A.; VAZ, A. F.; SANTANA, G. M.; GOMES, F. S.; COELHO, L. C.; PAIVA, P.M.; SILVA, R. M.; SILVA-LUCCA, R. A.; OLIVA, M. L.; GUARNIERI, M. C.; CORREIA M. T. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, 159(1), pp. 57-63, 2011.

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

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-Vilas, A. (Ed). **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Technology**, pp. 396-406, 2010.

PARK, E. J.; LEE, J. H.; YU, G. Y.; HE, G.; ALI, S. R.; HOLZER, R. G.; ÖSTERREICHER, C. H.; TAKAHASHI, H.; KARIN, M. Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. **Cell**, 140, pp. 197-208, 2010.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDINÁS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8(5), pp. 395-400, 2001.

PEEL, S.; BULMER, J. C. Lectins histochemistry of pregnant rat uterine tissues. **Journal Anatomy**, 188, pp. 197-205, 1996.

PENNA, M. **Dicionário brasileiro de plantas medicinais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Kosmos, 1946. 409 p.

PERCIVAL, R. S.; DEVINE, D. A.; DUGGAL, M. S.; CHARTRON, S.; MARSH, P. D. The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *European Journal of Oral Sciences*, 114, pp. 343-348, 2006.

PEREIRA, F. E. L. Inflamações. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. pp. 130-174.

PEREIRA-JUNIOR, F. N.; SILVA, H. C.; FREITAS, B. T.; ROCHA, B. A. M.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; LEAL, R. B.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Purification and characterization of a mannose/N-acetyl- d-glucosamine-specific lectin from the seeds of *Platymiscium floribundum* Vogel. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25(8), pp. 443-449, 2012.

PERISSINOTTI, D. M. N. Dor psicogênica. In: TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001. pp. 82-85.

PERRETT, S.; WHITFIELD, P. J. Currently available molluscicides. **Parasitol Today**, 12, pp. 156-159, 1996.

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

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, pp. 199-228, 1998.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGE, P. Classification of plant lectins in families of structural and evolutionary related proteins. In: **The molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001. pp. 27-54.

PIMENTA, C. A. M. **Atitudes de doentes com dor crônica frente à dor** (Tese livre-docência). São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo, 1999.

PIMENTA, L. P. S.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G. F.; BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytochemistry**, v. 10, pp. 209-212, 2003.

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

PIRES, A. F.; ASSREUY, A. M. S.; LOPES, E. A. B.; CELEDÔNIO, N. R.; SOARES, C. E. A.; RODRIGUES, N. V. F. C.; SOUSA, P. L.; BENEVIDES, R. G.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SANTOS, C. F. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of

*Canavalia brasiliensis*. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, DOI: 10.1111/j.1472-8206.2011.00987.x, 2011.

POINTER, J. P.; GIBODA, M. The case for biological control of snail intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Today**, 15, pp. 395-397, 1999.

PRADO, W. A. Neurofisiologia e neuroquímica da dor aguda e crônica. In: ANDRADE FILHO, A. C. C. (editor). **Dor: diagnóstico e tratamento**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2001. pp. 1-5.

PRICE, K. S.; WAGGY, G. T.; CONWAY, R. A. Brine shrimp bioassay and seawater BOD of petrochemicals. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, 46, pp. 63-77, 1974.

QIAOJUAN, Y.; ZHENGQIANG, J.; SHAOQING, Y.; WEI, D.; LUJIA, H. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 442, pp. 72-81, 2005.

QUEIROZ, M. L.; JUSTO, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA-DA-SILVA, F. R. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacology & Immunotoxicology**, 23(3), pp. 367-382, 2001.

RAISON, L. C.; CAPURON, L.; MILLER, A. H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends in Immunology**, 27, pp. 24-31, 2006.

RAMACHANDRAN, S.; VAMSIKRISHNA, M.; GOWTHAMI, K. V.; HEERA, B.; DHANARAJU, M. D. Assessment of cytotoxic activity of *Agave cantula* using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality bioassay. **Asian Journal of Scientific Research**, 4(1), pp. 90-94, 2011.

RAMASWAMY, S.; ROSS, K. N.; LANDER, E. S.; GOLUB, T. R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. **Nature Genetics**, v. 33, pp. 49-54, 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. ed. trad. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904 p.

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

REGO, E. J. L.; CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry**, v. 60, pp. 441-446, 2002.

REYNOSO-CAMACHO, R.; DE MEJIA, G. E.; LOARCA-PINA, G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). **Food and Chemical Toxicity**, v. 41, pp. 21-27, 2003.

RIBEIRO, S.; SCHMIDT, A. P.; SCHMIDT, S. R. G. O Uso de Opióides no Tratamento da Dor Crônica Não Oncológica: O Papel da Metadona. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 52(5), pp. 644-651, 2002.

RIPOLL, C.; FAVERY, B.; LECOMPTE, P.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; ABAD, P.; JOUANIN, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Science**, 164, pp. 517-523, 2003.

RIZZINI, C. T. **Botânica econômica brasileira**. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. 248 p.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J. B. S.; SAKATA, R. K. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, pp. 94-105. 2007.

ROJO, M. A.; CITORES, L.; JIMENEZ, P.; FERRERAS, J. M.; ARIAS, F. J.; MENDEZ, E.; GIRBES, T. Isolation and characterization of a new d-galactose-binding lectin from *Sambucus racemosa* L. **Protein and Peptide Letters**, v.10, pp. 287-293, 2003.

ROMERO, R.; ESPINOZA, J.; GONÇALVES, L. F.; KUSANOVIC, J. P.; FRIEL, L. A.; NIEN, J. K. Inflammation in preterm and term labour and delivery. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, 11, pp. 317-326, 2006.

RUDIGER, H. Plant lectins-more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica (Basel)**, v. 7, pp. 1 - 12, 1998.

SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 62, pp. 460-464, 2008.

SÁ, R. A.; ARGOLO, A. C. C.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; SANTOS, N. D. L.; MELO, C. M. L.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Antioxidant, *Fusarium* growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 63, pp. 470-477, 2009a.

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**, 4, pp. 85-95, 2009b.

SÁ, R. A.; SANTOS, N. D. L.; SILVA, C. S. B.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; CAVADA, B. S.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, 149, pp. 300-306, 2009c.

SAEED, M. A.; SABIR, A. W. Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Fitoterapia**, 72, pp. 807-809, 2001.

SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M. S. V.; DIAS, C. S.; COSTA, V. C. O.; CONDE, N. C. O.; BUZALAF, M. A. R. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, 124, pp. 289-294, 2009.

SAMUELSSON, B.; DAHLEN, S. E.; LINDGREN, J. A.; ROUZER, C. A.; SERHAN, C. N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science**, 237, pp. 1171-1176, 1987.

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A. A.; 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(4), pp. 1050-1055, 2006.

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

SANTOS PIMENTA, L. P.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G.; BOAVENTURA, M. A. Biological screening of annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp) test. *Phytomedicine*, 10, pp. 209-212, 2003.

SAWYNOK, J. Topical and Peripherally Acting Analgesics. **Pharmacological Reviews**, v. 55, pp. 1-20, 2003.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **American Journal of Clinical Nutrition**, 81, pp. 215S-217S, 2005.

SCHULTZBERG, M.; LINDBERG, C.; ARONSSON, A. F.; HJORTH, E.; SPULBER, S. D.; OPRICA, M. Inflammation in the nervous system - physiological and pathophysiological aspects. **Physiology & Behavior**, 92, pp. 121-128, 2007.

SERHAN, C. N. Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 7 (1), pp. 44-48, 2009.

SERHAN, C. N.; BRAIN, S. D.; BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; HASLETT, C.; O'NEILL, L. A. J.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G.; WALLACE, J. L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB Journal**, v. 21, pp. 325-332, 2007.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, 6, pp. 1191-1197, 2005.

SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **Journal of Biological Chemistry**, 282, pp. 2753-2764, 2007.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, 177, pp. 949-958, 1972.

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

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2*. Taiwan: **Kuwer Academic/Plenum Publishers**, pp. 1-19, 2001.

SHARON, N.; LIS, H. How Proteins Bind Carbohydrates: Lessons from Legume Lectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, pp. 6586-6591, 2002.

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

SHIMAMURA, T.; SHIROISHI, M.; WEYAND, S.; TSUJIMOTO, H.; WINTER, G.; KATRITCH, V.; ABAGYAN, R.; CHEREZOV, V.; LIU, W.; HAN, G. W.; KOBAYASHI, T.; STEVENS, R. C.; IWATA, S. Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. **Nature**, 475, pp. 65-70, 2011.

SILVA FILHO, C. R. M.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, T. G.; SILVA, T. M. S.; RIBEIRO, A. P. L. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 19(4), pp. 919-923, Out./Dez. 2009.

SILVA, M. D. C.; SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; SANTOS, N. D. L.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, 63, pp. 334-340, 2009.

SILVA, T. M. S.; BATISTA, M. M.; CAMARA, C. A.; AGRA, M. F. Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp. (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 4, pp. 419-425, 2005.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 2. ed. Barueri: Manole, 2003. 816 p.

SIMONS, F. E. R.; SIMONS, K. J. Histamine and H1-receptor antagonists. In: SMITH, C. M.; REYNARD, A. M. **Textbook of pharmacology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. pp. 1104-1118.

SINGH, O. K.; MISRA, T. M.; AGRAWAL, R. A. Molluscicides of plant origin. **Biological Agriculture & Horticulture**, 13, pp. 205-252, 1996.

SINGH, J.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S. A novel mitogenic and antiproliferative lectin from a wild cobra lily, *Arisaema flavum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 318(4), pp. 1057-1065, 2004.

SMITH, C. M. Opioid analgesics – agonists and antagonists. In: SMITH, C. M.; REYNARD, A. M. **Textbook of pharmacology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. pp. 226-250.



SOL, F. G. D.; CAVADA, B. S.; CALVETE, J. J. Crystal structures of *Bauhinia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer transition. **Journal of Structural Biology**, v. 158, pp. 1-9, 2007.

SORGELOOS, P.; REMICHE-VAN DER WIELEN, C.; PERSOONE, G. The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests: A critical analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2, p. 249, 1978.

SORGELOOS, P.; LAVENS, P.; LEGER, P.; TACKAERT, W.; VERSICHELE, D. Manual para el cultivo y uso de artemia en acuicultura. **Project reports**, n. 10, 1986. 312 p.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil**. Belo Horizonte: Ed. da FIOCRUZ/CPqRR, 1992.

SOUZA, A. B.; SOUZA, L. M. S.; CARVALHO, J. C. T.; MAISTRO, E. L. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. **Genetics and Molecular Biology**, 29, pp. 380-383, 2006.

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**, 65, pp. 696-702, 2011.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. 2 ed. Barueri: Manole, 2002, 655 p.

SUDHAKAR, M.; RAO CH, V.; RAO, P. M.; RAJU, D. B.; VENKATESWARLU, Y. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. **Fitoterapia**, 77, pp. 378-380, 2006.

SULAGNA, B.; SUJATA, N. K.; GANGULY, G.; MAJUMDAR, S. A biologically active lectin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biochimie**, v. 86, pp. 657-666, 2004.

SUYENAGA, E. S.; RECHE, E.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E.; CHAVES, C. G.; HENRIQUES, A. T. Anti-inflammatory investigation of some species of *Mikania*. **Phytotherapy Research**, 16, pp. 519-523, 2002.

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

TAN, W.; ZHANG, W.; STRASNER, A.; GRIVENNIKOV, S.; CHENG, J. Q.; HOFFMAN, R. M.; KARIN, M. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. **Nature**, 470, pp. 548-553, 2011.

TAYLOR, R. L.; CALDWELL, G. S.; BENTLEY, M. G. Toxicity of algal-derived aldehydes to two invertebrate species: Do heavy metal pollutants have a synergistic effect? **Aquatic Toxicology**, v.74, pp. 20-31, 2005.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da dor neuropática. In: TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001. pp. 41-57.

TEIXEIRA, M. J.; VALLE, L. B. S. Tratamento farmacológico da dor. In: TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001. pp. 93-130.

THAKUR, A.; RANA, M.; LAKHANPAL, T. N.; AHMAD, A.; KHAN, M. I. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*: Lectin from *Ganoderma lucidum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770(9), pp. 1404-1412, 2007.

THOMAS, G. **Química medicinal: uma introdução**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413 p.

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

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, 420, pp. 853-859, 2002.

TREECE, G. D. **Artemia Production for Marine Larval Fish Culture**. SRAC: Southern Regional Aquaculture Center, Publication n. 702, 2000.

TRINDADE, M. B.; LOPES, J. L. S.; SOARES-COSTA, A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; OLIVA, M. L. V.; BELTRAMINI, L. M. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, pp. 146-152, 2006.

TUMA, R. S. Breast cancer linked to obesity-induced inflammation. **Oncology Times**, pp. 13-14, 2011.

TURK, D. C.; MELZACK, R. **The measurement of pain and the assessment of people experiencing pain. Handbook of pain assesment**. New York London: The Guilford Press, 1992, pp. 3-12.

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

UEDA, H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU, M.; KAWANISHI, K.; ALVES, S. M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, 8, pp. 377-381, 2001.

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J. The NeuAc ( $\alpha$ -2,6)-GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark type-2 ribosome-inactivating protein with an usual specificity and structure. **European Journal of Biochemistry**, v. 235, pp. 128-137, 1996.

VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Plant lectins. **Advances in Botanical Research**, 48, pp. 107-209, 2008.

VAN STAPPEN, G. Introduction, biology and ecology of *Artemia*. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P. (Eds). Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. **FAO Fisheries Technical Paper**, 1996. 295 p.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, 72, pp. 1538-1550, 2011.

VANDENBORRE, G.; VAN DAMME, E. J. M.; SMAGGHE, G. Natural products: plant lectins as important tools in controlling pest insects. In: Ishaaya, I., Horowitz, A.R. (Eds.), **Biorational Control of Arthropod Pests: Application and Resistance Management**. Springer Science, pp. 163-187. 2009.

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

VANHAECKE, P.; PERSOONE, G.; CLAUS, C.; SORGELOOS, P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 5, pp. 382-387, 1981.

VASCONCELOS, C. F. B.; MARANHÃO, H. M. L.; BATISTA, T. M.; CARNEIRO, E. M.; FERREIRA, F.; COSTA, J.; SOARES, L. A. L.; SÁ, M. D. C.; SOUZA, T. P.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R. Genoma contra a Esquistossomose. **Scientific American Brasil**, 28, pp. 54-61, 2004.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, 44, pp. 385-403. 2004.

VAZ, A. F. M.; COSTA, R. M. P. B.; MELO, A. M. M. A.; OLIVA, M. L. V.; SANTANA, L. A.; SILVA-LUCCA, R.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. **Food Chemistry**, 119, pp. 1507-1513, 2010.

VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia: Manual das Plantas Mediciniais**. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, 1992. 347 p.

WALL, P. D.; MELZACK, R. The measurement of pain and the assessment of the people experiencing pain. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. (editors). **Textbook of Pain**. Edimburgh: Churchill Livingstone, 1994, p. 3.

WALTHER, D. J.; PETER, J. U.; BASHAMMAKH, S.; HORTNAGL, H.; VOITS, M.; FINK, H.; BADER, M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. **Science**, 299, p. 76, 2003.

WANDERLEY, A. G. Hypoglycemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 137, pp. 1533-1541, 2011.

WANG, H.; GAO, J.; NG, T. B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus Ostreatus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 275, pp. 810-816, 2000.

WANG, H. X.; LIU, W. K.; NG, T. B.; OOI, V. E. C.; CHANG, S. T. The immunomodulatory and antitumor activities of lectins from the mushroom *Tricholoma mongolicum*. **Immunopharmacology**, 31, pp. 205-211, 1996.

WANG, H. X.; NG, T. B. A novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots with sequence similarity to Kunitz-type soybean trypsin inhibitor. **Life Sciences**, 69, n. 3, pp. 327-333, 2001.

WANG, S.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; OBATA, K.; CUI, X.; TOMINAGA, M.; NOGUCHI, K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain**, 131, pp. 1241-1251, 2008.

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

WEINSTOCK, J. V. The pathogenesis of granulomatous inflammation and organ injury in schistosomiasis: interaction between the schistosome ova and the host. **Immunological Investigations**, 21, pp. 455-475, 1992.

WEST, K. A.; BROGNARD, J.; CLARK, A. S.; LINNOILA, I. R.; YANG, X.; SWAIN, S. M.; HARRIS, C.; BELINSKY, S.; DENNIS, P. A. Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, 111(1), pp. 81-90, 2003.

WHITE, H. S. Histamina e anti-histamínicos. In: GENNARO, A. R. (editor). **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. pp. 1522-1528.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Molluscicide screening and evaluation. **Bulletin of the World Health Organization**, 33(4), pp. 567-581, 1965.

WONG, J. H.; NG, T. B. Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 301(2), pp. 545-550, 2003.

WONG, J. H.; NG, T. B.; CHEUNG, R. C.; YE, X. J.; WANG, H. X.; LAM, S. K.; LIN, P.; CHAN, Y. S.; FANG, E. F.; NGAI, P. H.; XIA, L. X.; YE, X. Y.; JIANG, Y.; LIU, F. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 87, pp. 1221-1235, 2010.

WU, A. M.; LISOWSKA, E.; DUK, M.; YANG, Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. **Glycoconjugate Journal**, 26, pp. 899-913, 2009.

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

YADAV, V. K.; RYU, J. H.; SUDA, N.; TANAKA, K. F.; GINGRICH, J. A.; SCHÜTZ, G.; GLORIEUX, F. H.; CHIANG, C. Y.; ZAJAC, J. D.; INSOGNA, K. L.; MANN, J. J.; HEN, R.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Lrp5 Controls Bone Formation by Inhibiting Serotonin Synthesis in the Duodenum. **Cell**, 135, pp. 825-837, 2008.

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

YAO, D.; PAN S.; ZHOU, M. Structural characterization and antitumor and mitogenic activity of a lectin from the gill of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). **Fish Physiology and Biochemistry**, DOI: 10.1007/s10695-012-9678-1, 2012.

YE, X. Y.; NG, T. B.; TSANG, P. W. K.; WANG, J. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Protein Chemistry**, 20, pp. 367-375, 2001.

ZHAO, C.; SUN, H.; TONG, X.; QI, Y. An antitumour lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. **Biochemical Journal**, 374, pp. 321-327, 2003.

#### 4 APÊNDICE A - CAPÍTULO I

### ANTI-INFLAMMATORY AND ANALGESIC POTENTIAL OF

*Caesalpinia ferrea*

Artigo *publicado* no periódico **Revista Brasileira de Farmacognosia (IF: 3.46)**

## Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*

Sandrine Maria A. Lima,<sup>1</sup> Larissa Cardoso C. Araújo,<sup>1</sup> Marília Maria Sitônio,<sup>1</sup> Ana Carina C. Freitas,<sup>2</sup> Sirlene L. Moura,<sup>1</sup> Maria Tereza S. Correia,<sup>2</sup> Diana Jussara N. Malta,<sup>1</sup> Teresinha Gonçalves-Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil,

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

**Abstract:** *Caesalpinia ferrea* Mart. belongs to the family Fabaceae. Known as pau-ferro and jucá, it is used in folk medicine to treat diabetes, as antipyretic and antirheumatic. This study aimed to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanol extract of the fruits of *C. ferrea* (EECf). In the evaluation of anti-inflammatory activity, EECf (50 mg/kg) produced significantly inhibition of ear edema by 66.6% compared to control. Indomethacin (10 mg/kg) showed inhibition of 83.9% compared to control. EECf (50 mg/kg) inhibited of vascular permeability induced by acetic acid and was also able to reduce of cell migration to the peritoneal cavity induced by thioglycolate. In the writhing test induced by acid acetic, EECf (12.5, 25 and 50 mg/kg) significantly reduced the number of contortions by 24.9, 46.9 and 74.2%, respectively. In the formalin test, EECf presented effects only in the second phase. The results provided experimental evidence for the effectiveness of the traditional use of *C. ferrea* in treating various diseases associated with inflammation and pain.

Revista Brasileira de Farmacognosia  
Brazilian Journal of Pharmacognosy  
22(1): 169-175, Jan./Feb. 2012



### Article

Received 4 Mar 2011

Accepted 1 Aug 2011

Available online 1 Nov 2011

#### Keywords:

anti-inflammatory activity  
antinociceptive activity  
cellular migration  
*Caesalpinia ferrea*

ISSN 0102-695X

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000197>

### Introduction

*Caesalpinia ferrea* Mart. is a tree that belongs to the family Fabaceae. It is commonly known as "pau-ferro" or "jucá", which grows throughout Brazil and is widely distributed in the North and Northeast, especially in Pernambuco and Ceará (Pio Correia, 1984).

Some therapeutic properties of *C. ferrea* were described and include antiulcerogenic (Bacchie et al., 1995), anti-inflammatory and analgesic properties (Thomas et al., 1998). In addition, it has been shown to have cellulase, amylase and anticoagulant activities and to kill *Aedes aegypti* larvae (Cavalheiro et al., 2009). The fruits have also been used to treat diabetes (Balbach, 1972) and to prevent cancer. Treatment with the fruits significantly decreased the average number of papillomas per mouse in experiments of the promoting effects of 12-*O*-tetra-decanoylphorbol-13-acetate (TPA) on skin tumor formation in mice initiated with 7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene (DMBA) (Nakamura et al., 2002). *C. ferrea* roots are used as antipyretics and antidiarrheals, and the decoction of the wood is healing and antisecretory (Lewis, 1987). The stem bark is used as a decongestant, for treatment of enterocolitis, an anti-diarrheal (Balbach, 1972), and for

the treatment of rheumatism and may be beneficial to the cardiovascular system (Menezes et al., 2007). A preliminary phytochemical study of the hydroalcoholic extracts of stem, bark and leaves showed the presence of flavonoids, saponins, tannins, coumarins, sterols and phenolic compounds (Gonzalez et al., 2004). However, despite indications of the popular use of this plant for inflammatory processes, the literature reports few studies with the ethanol extract of the fruits, and there are no comprehensive studies on its possible mechanisms of action. Therefore, this study aimed to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanol extract of the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart.

### Material and Methods

#### Plant material

The pods (peels and seeds) of *Caesalpinia ferrea* Mart., Fabaceae, were collected at Barbalha-CE, Brazil (latitude 7° 18' 40", longitude 7° 18' 40"), in June 2007. They were dried at 40 °C in an incubator with circulating air for 48 h and ground in a grinder. The botanical material was identified by researchers at

### Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*

Sandrine Maria A. Lima et al.

the Instituto Agronômico de Pernambuco. A voucher specimen was prepared and stored at the Herbarium IPA - Dárdano de Andrade Lima, under the number 83.566.

#### Reagents

Carrageenan and Evans blue were purchased from Sigma (St. Louis, MO), sodium thioglycolate, xylene and formalin were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Indomethacin was purchased from Merk Sharp & Dome and Fentanyl was obtained from Janssen Cilag Farmaceutica.

#### Preparation of extract

The ethanol extract of *C. ferrea* (EECf) was obtained by repeated soaking under agitation in 95% ethanol P.A. at a ratio of 1:5, until the depletion of substances extractable by ethyl alcohol. To concentrate the extract, ethanol was removed from the filtrate using a rotary evaporator at 40 °C under reduced pressure.

#### Animals

Females Swiss albino mice (*Mus musculus*) (n=3) were used for acute toxicity evaluation and males (n=7) for evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities. The animals were approximately 50 days old and weighed 25±5 g. Mice were obtained from the animal house of the Antibiotics Department of the Federal University of Pernambuco (UFPE), which is registered with the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) under n° 18. The animals were divided into groups and kept in plastic boxes at room temperature (22±3 °C) with a light:dark cycle of 12:12 h. They received standard chow (Purina) and water *ad libitum*. All animals used for determination of anti-inflammatory and antinociceptive activities were fasted for 4 h before the experiment.

The protocol was approved by the Animal Ethics (CEEA) of UFPE (number 40/06) and is in accordance with the Brazilian legislation dealing with the use of animals for scientific purposes.

#### Acute toxicity single dose

The acute toxicity study of *C. ferrea* followed the guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development, which authorizes the use of three animals per dose according to Guideline 423 and the guidelines of the Ordinance of the Ministry of Health 116/96 for evaluation of chemical substances and toxicity studies of single doses of new drugs (OECD, 2001). The study also followed the requirements of the

RDC 17 (24/02/2000) from Anvisa/MS. The technique involved administration of sequentially lower doses from the maximum of 2000 mg/kg to groups of three animals sequentially lower doses from the maximum of 2000 mg/kg if they note the deaths of more than one animal. This yielded an estimate of the LD50 according to the standards of the GHS (Globally Harmonized System of Classification). The treated animals received the EECf (2000 mg/kg) orally, while the negative control animals received saline:propylene glycol (1:1). After the administration of EECf, the mice were observed for 24 h, and mortality was noted. The test was repeated once.

#### Evaluation of anti-inflammatory activity

##### Thioglycolate induced peritonitis

The mice were treated orally with the vehicle, EECf (12.5, 25 and 50 mg/kg) or indomethacin (10 mg/kg). The doses were chosen according to the results of a pilot study conducted in our laboratory and also based on studies of the literature (Carvalho et al., 1996). One hour after treatment, the animals received an intraperitoneal injection of 0.5 mL of sodium thioglycolate (3%). After 4 h, the animals were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber, and 2 mL of saline containing EDTA was injected into the peritoneal cavity. The total leukocytes that migrated into the peritoneal cavity in the recovered samples were counted in a Neubauer chamber (Bonhomme-Faivre et al., 2000). This test was used for initial screening to select the best dose (50 mg/kg) for the other tests of anti-inflammatory activity. Indomethacin was chosen as a positive control because it is a very effective anti-inflammatory nonsteroidal drug that is widely used in the literature (Gupta et al., 2003; Tunalier et al., 2007).

##### Xylene-induced ear edema

Sixty minutes after oral administration of the EECf (50 mg/kg), 20 µL of xylene was applied to the anterior and posterior surfaces of the right ear. The left ear was utilized as a control. Two hours after xylene application, the mice were killed and both ears were removed. Circular sections were taken using a cork borer with a diameter of 7 mm, and the sections were weighed. The increase in weight caused by the irritant was measured by subtracting the weight of the untreated left ear section from that of the treated right ear section. The formula to calculate the percentage of inhibition was the average of the edema in the control group (normal saline) minus the average of the edema in the drug group divided by the average of the edema in the control group x 100%. Individuals in the control



groups received vehicle, and indomethacin (10 mg/kg) was used as a reference; both were given orally (Akindele & Adeyemi, 2006).

Vascular permeability induced by acetic acid in mice

The test was performed using the technique described by Whittle (1964). The mice were treated orally with vehicle, EECf (50 mg/kg) or indomethacin (10 mg/kg). One hour after treatment, Evans blue dye (1%) was injected into the retro-orbital plexus (0.2 mL/animal) under associative anesthesia with ketamine/xylazine. Next, 0.5 mL of acetic acid (1%) was administered intraperitoneally. After 30 min, the mice were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber and intraperitoneally injected with 2 mL of saline. The exudate was collected and centrifuged at 200 × g for 10 min. The absorbance of the supernatant was read at 610 nm with ELISA (thermo plate).

#### Evaluation of anti-nociceptive activity

##### Writhing test

One hour after the oral administration of the EECf (12.5, 25 and 50 mg/kg), the mice were injected intraperitoneally with 1% v/v acetic acid solution (volume of injection 0.1 mL/10 g). The mice were placed individually into glass beakers for an initial ten-minute period. The number of writhes produced in these animals was counted for the next 20 min, according to the methodology described with minor modifications (Koster et al., 1959). The control group received vehicle, and ibuprofen (300 mg/kg) was used as a reference drug (Sun et al., 2008; Jones et al., 2007). This test was used as an initial screening to select the best dose (50 mg/kg) for the remaining tests of the antinociceptive activity.

##### Formalin test

The formalin test was performed according to the methodology described by Hunskaar & Hole (1987). The animals were injected with 20 µL of formalin 2.5% (0.92% formaldehyde diluted in saline) in the sub-plantar area of the right hind paw. The duration of paw licking was measured for 1-5 min (first phase) and 15-30 min (second phase) after the formalin injection. The amount of time spent licking the injected paw was considered to be the nociceptive response. Animals received vehicle and EECf (50 mg/kg) orally 30 min prior to the injection of formalin. Fentanyl (200 µg/kg, s.c.) was administered 15 min prior to the injection of formalin. Fentanyl was used as a standard drug based

on literature (Rocha et al., 2008; Romero et al., 2010).

#### Statistical analysis

The results were expressed as mean±SD for each experimental group. Statistical comparison of groups was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Bonferroni's test. Statistical significance was considered to be indicated by a *p* value <0.05 in all cases, using the software Graph Pad prism. 5.0.

## Results

#### Acute toxicity

The method proposed by Litchfield & Wilcoxon (1949) recommended determining the LD50 when the approximate lethal dose is less than 2 g/kg. In this study, we showed that a dose of 2 g/kg did not cause death in animals, so we discarded the determination of an LD50. The treated group exhibited ptosis and drowsiness immediately following gavage; however, no animals died.

#### Evaluation of anti-inflammatory activity

##### Thioglycolate-induced peritonitis

According to statistical analysis, the EECf was effective in inhibiting the inflammatory response (Figure 1). The effect was most pronounced at the doses of 25 and 50 mg/kg, which inhibited cell migration of 68.4% (4.14±0.5 × 10<sup>6</sup>) and 71.8% (3.69±0.5 × 10<sup>6</sup>), respectively, compared to control.



**Figure 1.** Inhibition of cell migration by EECf (12.5, 25 and 50 mg/kg, *p.o.*) in thioglycollate-induced peritonitis. Results are expressed as mean±SD for each experimental group (n=7). Significant after analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test with confidence interval of 95% compared to the control group. \**p*<0.05 compared to control.

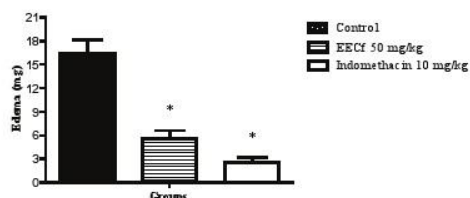
##### Xylene-induced ear edema

The effect of the extract on the xylene-induced ear edema in mice is shown in Figure 2. The administration of EECf (50 mg/kg) reduced the ear

### Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*

Sandrine Maria A. Lima et al.

edema by 66.6% ( $5.5 \pm 1.2$ ) compared to the control group ( $16.4 \pm 1.7$ ). Indomethacin (10 mg/kg) produced an inhibition of 83.9% compared to control.



**Figure 2.** Effect of EECf in the ear edema induced by xylene. Results are expressed as mean±SD for each experimental group (n=7). Significant after analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test with confidence interval of 95% compared to the control group. \* $p < 0.05$  compared to control group.

#### Vascular permeability induced by acetic acid

In order to evaluate the action of EECf in the release of vasoactive amines (histamine, bradykinin and serotonin) and edema formation, we evaluated its effect on vascular permeability induced by acetic acid (Figure 3). EECf (50 mg/kg) significantly inhibited vascular permeability in 66.1% compared to control.

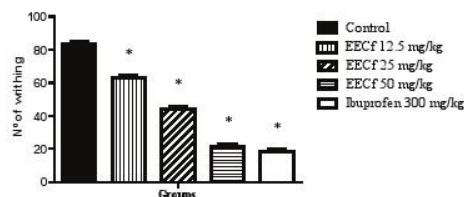


**Figure 3.** Effect of EECf in the vascular permeability induced by acetic acid measured as Evans blue dye extravasation in swiss albino mice males (n=7). Significant after analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test with confidence interval of 95% compared to the control group. \* $p < 0.05$  compared to control.

#### Evaluation of anti-nociceptive activity

##### Writhing test

Figure 4 shows that EECf (12.5, 25 and 50 mg/kg) significantly inhibited writhing induced by acetic acid in 24.9, 46.9 and 74.2%, respectively, when compared to control. This response was dose-dependent. Ibuprofen (300 mg/kg) inhibited the writhing response by 78%. Ibuprofen was used as positive control for its potent analgesic properties, as described in the literature (Sun et al., 2008; Jones et al., 2007).



**Figure 4.** Response observed in the writhing test induced by acetic acid with EECf in the doses of 12.5, 25 and 50 mg/kg in swiss albino mice (*Mus musculus*) males (n=7). Results are expressed as mean±SD for each experimental group. Significant after analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test with confidence interval of 95% compared to the control group. \* $p < 0.05$  compared to control group.

##### Formalin test

Table 1 shows that in the first phase of formalin-induced nociception, the oral pre-treatment with EECf (50 mg/kg) significantly modified the licking time of the animals when compared to control group. The second phase of the test extract showed 34.0% inhibition of nociception compared to control. The fentanyl inhibited the licking time in 92.9 and 96.7% in the first and second phases, respectively. The fentanyl was used as reference drug in accordance with the studies of Rocha et al. (2008).

**Table 1.** Effect of EECf in the nociception induced by formalin.

Group	Dose (mg/kg)	Paw licking (s) (mean±SEM)		Inhibition (%)	
		0-5 min	20-30 min	0-5 min	20-30 min
Control	—	57.8±4.1	177.9±13.9	—	—
EECf	50	47.6±3.5*	116.7±7.9*	17.6	74.3
Fentanyl	200	4.1±0.4*	5.8±0.5*	93.0	96.7

\* $p < 0.05$  compared to the control. Significant after analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test with confidence interval of 95% compared to the control group, n=7 animals for group.

#### Discussion

Our results indicated that the ethanol extract of *C. ferrea* has low oral acute toxicity. The 2 g/kg dose did not cause death in animals, so we discarded the determination of an LD<sub>50</sub> (Litchfield & Wilcoxon, 1949).

In order to evaluate the effect of EECf on cell migration to the peritoneal cavity, we tested its effect on the induction of peritonitis by thioglycolate. The levels of inhibition of cellular migration by 25 and 50 mg/kg of EECf were not statistically different and

were comparable to the effects produced by 10 mg/kg indomethacin. In the model of peritonitis induced by thioglycolate, both mast cells and macrophages act to increase vascular permeability (Kolaczowska et al., 2002). Based on the response to EECf treatment, we hypothesize that substances present in the extracts are inhibiting the activation of mast cells and macrophages.

Xylene is an irritant that causes increased vascular permeability and edema due to the release of mediators and cellular migration (Hosseinzadeh et al., 2003). EECf significantly inhibited the production of edema compared to the vehicle treatment, probably due to a reduction in vascular permeability. The technique developed by Henriques et al., (1987) is a classic model to evaluate specific acute inflammation in mice that involves various types of chemical mediators of inflammation, such as histamine, serotonin, bradykinin and prostaglandins.

To confirm the reduction of edema mediated by EECf in the xylene-induced ear edema assay, we tested the extract in the model of vascular permeability induced by acetic acid. The results showed that EECf reduced permeability and was effective in the first phase of the inflammatory response, which is characterized by the action of vasoactive amines. The effect of treatment with 50 mg/kg EECf was comparable to that of treatment with 10 mg/kg indomethacin, which is a promising level of activity. Acetic acid can cause an increase of chemical mediators such as prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), histamine and serotonin in peritoneal fluids, leading to an increase in vascular permeability (Choi et al., 2006). The ethanol extract of the *C. ferrea* significantly inhibited the acetic-acid-induced vascular permeability in mice. These results suggested that *C. ferrea* exerted an anti-inflammatory action similar to that of indomethacin (a nonselective COX inhibitor) and inhibited the mediators of the acute phase of inflammation.

The analgesic activities of EECf were evaluated using two animal models. EECf was effective in the writhing test (Figure 4), which is used to screen for both peripherally and centrally acting agents (Le Bars et al., 2001). Induction of writhing by acetic acid allows the evaluation of antinociceptive responses to different types of drugs (*i.e.*, anticholinergics and antihistamines). It triggers the activation of various events that determine the nociception, such as the release of mediators such as histamine, bradykinin and PGE<sub>2</sub>. This model is sensitive to analgesic substances that have either central or peripheral mechanisms of action (Koster et al., 1959). EECf exhibited a dose-dependent effect in the writhing test, and a dose of 50 mg/kg had antinociceptive effects comparable to those of ibuprofen.

These findings indicated, therefore, the antinociceptive activity of EECf may result from direct or indirect inhibition of the release of pro-inflammatory mediators induced by acetic acid, such as prostaglandins and cytokines. Acetic acid acts indirectly to cause the release of endogenous substances involved in the modulation of nociception, including bradykinin, serotonin, histamine and prostaglandins (Witkin et al., 1961). Recently, Ribeiro et al. (2000) showed that the nociception induced by this stimulus also depends on the release of cytokines such as IL-1 $\beta$ , TNF, IL-8 from macrophages and basophils residents in the abdominal cavity. Together with the other mediators mentioned previously, these factors could induce the nociception observed in this study. These data, together with the data obtained on the effect of EECf on vascular permeability, lead us to hypothesize that the activity of the extract may involve the participation of resident macrophages.

The formalin test has an advantage over other frequently used tests as it involves a biphasic response with an early and a late phase representing, respectively, neurogenic and inflammatory pain (Hunnskaar & Hole, 1987). This is of interest considering that both phases are sensitive to centrally acting drugs, such as opioids (Shibata et al., 1989). However, the second phase is also sensitive to NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs) and corticosteroids (Hunnskaar & Hole, 1987). In this study, EECf (50 mg/kg) significantly inhibited ( $p < 0.05$ ) the second phase and weakly affected the first phase, suggesting that the main mechanism of action occurs at the peripheral level.

In our study, the ethanol extract of *C. ferrea* was capable of inhibiting inflammatory reactions and pain. The results provided experimental evidence for its traditional use in treating various diseases associated with inflammation and pain. The mechanism involved was not elucidated in the present study. Further studies currently in progress will enable us to understand the precise mechanisms involved.

#### Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco and Universidade Federal de Pernambuco for financial support.

#### References

- Akindele AJ, Adeyemi OO 2006. Anti-inflammatory activity of the aqueous leaf extract of *Byrsocarpus coccineus*. *Fitoterapia* 78: 25-28.
- Bacchie EM, Sertie JAA, Villa N, Katz H 1995. Anti-



Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*

Sandrine Maria A. Lima et al.

- ulceration and toxicity of *Stryrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* Mart. *Planta Med* 61: 204-207.
- Balbach A 1972. *As Plantas que curam*. São Paulo: Edições A Edificação do Lar.
- Bonhomme-Faivre L, Depraetere P, Savelli MP, Amdidouche D, Bizi E, Seiller M, Orbach-Arbouys S 2000. Charcoal suspension for tumor labelling modifies macrophage activity in mice. *Life Sci* 66: 817-827.
- Carvalho JC, Teixeira JR, Souza PJ, Bastos JK, dos Santos Filho D, Sarti SJ 1996. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *J Ethnopharmacol* 53: 175-178.
- Cavalheiro MG, Farias DF, Fernandes GS, Nunes EP, Cavalcanti FS, Vasconcelos IM, Melo VMM, Carvalho AFU 2009. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. *Rev Bras Farmacogn* 19: 586-591.
- Choi JH, Jung BH, Kang OH, Choi HJ, Park PS, Cho SH, Kim YC, Sohn DH, Park H, Lee JH, Kwon DY 2006. The anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of ethyl acetate fraction of *Cynanchi paniculati* radix. *Biol Pharm Bull* 29: 971-975.
- Gonzalez FG, Barros SBM, Bacchi EM 2004. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. In: *LX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia* da FCF-USP. São Paulo, Brasil.
- Gupta M, Mazumdar UK, Sivakumar T, Vamsi ML, Karki SS, Sambathkumar R, Manikandan L 2003. Evaluation of anti-inflammatory activity of chloroform extract of *Bryonia laciniata* in experimental animal models. *Biol Pharm Bull* 26: 1342-1344.
- Henriques MGMO, Silva PMR, Martins MA, Flores CA, Cunha FQ, Assreuy-Filho J, Cordeiro RSB 1987. Mouse paw edema. A new model for inflammation. *Braz J Med Biol Res* 20: 243-249.
- Hosseinzadeh H, Haddadkhodaparast MH, Arash AR 2003. Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity effects of *Salvia leriifolia* Benth seed extract in mice and rats. *Phytother Res* 17: 422-425.
- Hunnskaar S, Hole K 1987. The formalin test mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30: 103-114.
- Jones CK, Peters SC, Shannon HE 2007. Synergistic interactions between the dual serotonergic, noradrenergic reuptake inhibitor duloxetine and the non-steroidal anti-inflammatory drug ibuprofen in inflammatory pain in rodents. *Eur J Pain* 11: 208-215.
- Kolaczowska E, Shahzidi S, Seljelid R, Van Rooijen N, Plytycz B 2002. Early vascular permeability in murine experimental peritonitis is mediated by resident peritoneal macrophages and mast cells: crucial involvement of macrophage derived cysteinyl-leukotrienes. *Inflammation* 26: 61-71.
- Koster R, Anderson M, De Beer EJ 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* 18: 412-416.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53: 597-652.
- Lewis GP 1987. *Legumes of Bahia*. Inglaterra: Royal Botanic Garden.
- Litchfield JT Jr, Wilcoxon F 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 96: 99-113.
- Menezes IAC, Moreira IJA, Carvalho AA, Antonioli AR, Santos MRV 2007. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea* Mart.: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. *Vasc Pharmacol* 47: 41-47.
- Nakamura ELS, Kurosaki F, Arisawa M, Mukainaka T, Okuda M, Tokuda H, Nishino H, Pastore Jr 2002. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* Mart and related compounds. *Cancer Lett* 177: 119-124.
- Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) 2001. *Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method*. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Pio Corrêa M 1984. *Dicionário de plantas úteis no Brasil*. Rio de Janeiro, Brasil: Imprensa Nacional.
- Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato ABP, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol* 387: 111-118.
- Rocha FF, Neves EMN, Costa EA, Matos LG, Müller AH, Guilhon GMS, Cortes WS, Vanderlinde FA 2008. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). *Rev Bras Farmacogn* 18: 344-349.
- Romero A, Miranda HF, Puig MM 2010. Antinociceptive effects of morphine, fentanyl, tramadol and their combination, in morphine-tolerant mice. *Pharmacol Biochem Behav* 97: 363-369.
- Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 38: 347-352.
- Sun XY, Wei CX, Chai KY, Piao HR, Quan ZS 2008. Synthesis and anti-inflammatory activity evaluation of novel 7-alkoxy-1-amino-4,5-dihydro[1,2,4]triazole[4,3-a]quinolines. *Arch Pharm (Weinheim)* 341: 288-293.
- Thomas G, Araújo CC, Souza PS 1998. Avaliação das atividades anti-inflamatória, analgésica e antipirética dos extratos aquosos de *Caesalpinia ferrea*, *Plantago major*, *Polygonum acre* e *Pterodon polygaeflorus*. 10<sup>th</sup> Brazilian Symposium in Medicinal Plants. São Paulo, Brasil.
- Tunalier Z, Koşar M, Küpeli E, Caliş I, Başer KH 2007. Antioxidant, anti-inflammatory, anti-nociceptive

Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*  
Sandra Maria A. Lima et al.

activities and composition of *Lythrum salicaria* L. extracts. *J Ethnopharmacol* 110: 539-547.

Whittle BA 1964. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. *Br J Pharmacol* 2: 246-253.

Witkin LB, Huebner CF, Galdi F, O'keefe E, Spitaletta P, Plummer AJ 1961. Pharmacognosy of 2 amino-indane hydrochloride (Su 8629): a potent non-narcotic analgesic. *J Pharmacol Exp Ther* 133: 400-408.

**\*Correspondence**

Teresinha Gonçalves-Silva  
Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco  
Av. Artur Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE  
teresinha.goncalves@ppq.cnpq.br  
Tel: +55 81 2126 8347  
Fax: +55 81 2126 8346

**5 APÊNDICE B - CAPÍTULO II****BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* VAR.  
*parvifolia* (MART. EX TUL.) L. P. QUEIROZ POD PREPARATIONS**

Artigo *publicado* no periódico **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM) (IF: 4.774)**

## Research Article

# Biological Activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations

A. C. C. Freitas,<sup>1</sup> N. C. A. Ximenes,<sup>1</sup> J. S. Aguiar,<sup>2</sup> S. C. Nascimento,<sup>2</sup>  
 T. U. L. Lins,<sup>2</sup> L. R. Magalhães,<sup>2</sup> L. C. B. B. Coelho,<sup>1</sup> M. G. Carneiro-da-Cunha,<sup>1</sup>  
 T. Gonçalves-Silva,<sup>2</sup> and M. T. S. Correia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil

Correspondence should be addressed to M. T. S. Correia, terezacorreia.ufpe@gmail.com

Received 13 February 2012; Revised 25 March 2012; Accepted 26 March 2012

Academic Editor: Andreas Sandner-Kiesling

Copyright © 2012 A. C. C. Freitas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Libidibia ferrea* has been used in folk medicine throughout Brazil, and this study evaluated the biological activities of crude extract (CE) as well as a partially purified fraction (F80) obtained from its pods. Results from the MTT assay revealed that only F80 inhibited NCI-H292 cell growth; however, neither CE nor F80 reduced HEP-2 cell growth or sarcoma 180 tumor weight with the *in vivo* assay. Acute oral toxicity of the extract and fraction was evaluated following the steps of Guideline 423, using female mice; LD<sub>50</sub> for both preparations was determined as 2,500 mg/kg body weight. CE and F80 promoted a reduction of the leukocyte number and nitrite level in inflammatory exudates when the anti-inflammatory assay (carrageenan-induced peritonitis) was performed. CE and F80 inhibited writhing regarding antinociceptive activity (acetic acid-induced writhing response in mice). In conclusion, CE and F80 have no significant cytotoxic or antitumor activities in cell lines showing low toxicity and no action against tumors *in vivo*. Both preparations revealed anti-inflammatory and antinociceptive activities, corroborating the pharmacological basis of *L. ferrea* for ethnomedical use.

## 1. Introduction

Anticancer, pain relief, and anti-inflammatory drugs with weak adverse effects are some of the most important goals in modern research; natural products, especially plant-derivative substances, play a role in this search for an ideal treatment.

*Libidibia ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz (Leguminosae), whose basionym is *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. (Caesalpinaceae) [1], is a tree that grows throughout Brazil, especially in the north and northeast regions [2, 3].

*L. ferrea* aqueous and alcoholic preparations are used popularly to treat a number of diseases such as diabetes, rheumatism, and cancer and also are said to litigate diarrhea, inflammation, and pain, among other symptoms [2, 4–7].

Some *L. ferrea* therapeutic properties have been studied including its antitumor effects [6, 8].

The cytotoxic and antitumor activities of an aqueous extract and a fraction obtained from the *L. ferrea* pods as well as preparation effects on the first moments of inflammation and nociception, using *in vitro* and *in vivo* assays, were investigated in light of its ethnomedical applications.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Plant Material.** *L. ferrea* pods were collected from Ibirimir City, State of Pernambuco, Northeastern Brazil, in August (period of fruit abundance), 2006, and identified by A. Bocage. A sample of the collected material is archived as voucher specimen number 83566, IPA, at the herbarium

“Dárdano de Andrade Lima” (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Brazil).

**2.2. CE and F80 Preparations.** A crude, aqueous extract (CE) was prepared using pod powder in 0.9% NaCl (10% w/v) by gentle shaking for 16 h, at 4°C, passed through gauze, centrifuged (10000 × g) for 15 min, and filtered. Thereafter, proteins were precipitated over 4 h by 0–80% ammonium sulphate fractionation at room temperature; resuspended precipitate was dialyzed against distilled water followed by 0.9% NaCl (F80). Samples were stored at –20°C and subsequently lyophilized. The yield of total dried powder was 25% and 2.94% for CE and F80, respectively.

**2.3. Animals.** Swiss albino female and male mice (*Mus musculus*) weighing approximately 25 g (±50 days old) were obtained from the bioterium of the Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) and maintained under constant conditions (temperature: 22 ± 2°C, humidity: 40–60%, 12 h light/12 h dark cycle). The mice were allowed access to standard rodent chow diet (Purina) and water *ad libitum*. These experiments were approved by the Comitê de Ética em Experimentação Animal, Centro de Ciências Biológicas (CEEA-UFPE), Brazil.

**2.4. Cytotoxic Activity Evaluation.** The cell lines used for the *in vitro* cytotoxicity assays were NCI-H292 (human lung mucoepidermoid carcinoma cells) and HEP-2 (human larynx epidermoid carcinoma cells) obtained from the Instituto Adolph Lutz (São Paulo, Brazil). The cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) and supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.

**Cell Viability.** Trypan Blue 0.4% (w/v) was used in sodium phosphate buffer (PBS). It penetrates easily into damaged cells staining them blue, while the intact ones remain colorless, allowing determination of living and dead cell percentages. Cells were counted with an inverted LEITZ microscope and a hemocytometer filled with a homogeneous cell suspension aliquot.

**Cytotoxicity.** To determine cytotoxicity, a cell suspension (10<sup>5</sup> cells/mL) was prepared and distributed in wells of flat-bottom microtiter culture plates. They were incubated in a humidified 5% CO<sub>2</sub> air atmosphere at 37°C for 24 h; following that, CE and F80 samples at different protein concentrations (50.0; 25.0; 12.5; 6.25 µg/mL) were added and incubated under the same conditions for 72 h [9]. Control wells received only 0.9% sterile NaCl solution; after that, 25 µL of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-biphenyl tetrazolium bromide (MTT) in PBS (5 mg/mL, w/v) was added, and the plates were maintained at 37°C for 2 h. Culture medium with MTT was suctioned, and dimethylsulphoxide (DMSO) was added to dissolve formazan crystals [10]. MTT assay is based on the capability of living cells to reduce yellow tetrazolium salt into insoluble, purple

formazan [11] which precipitates due to the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase active in living cells [12]. Optical density was carried out at 595 nm. Mean optical density (OD) of the test wells was compared to mean OD of control wells to determine IC<sub>50</sub> (concentration that inhibits 50% of cell growth in relation to control). According to National Cancer Institute (NCI), values of IC<sub>50</sub> ≤ 30 µg/mL, for nonpure products (e.g., extracts), are considered significant [13].

**2.5. Acute Oral Toxicity.** The extract and fraction were evaluated following the steps of Guideline 423 [14] using female mice. Animals were prevented by eating overnight prior to the experiment. Three animals for each preparation were orally given a single dose starting at 300 mg/kg (mg of product/kg of body weight) and observed for 14 days (during the first hour after treatment and then once per day). CE and F80 were dissolved in a 0.9% NaCl sterile saline solution (saline), and the calculation of the exact dose for each mouse was based on individual weights. This first step was repeated in the same way for confirmation of results, and a higher dose (2000 mg/kg) was administered using different female mice.

**2.6. Antitumor Activity.** Studies were carried out in male mice, six animals per group, aiming to investigate the *in vivo* antitumor activity of CE and F80 against sarcoma 180.

CE, F80, and methotrexate (MTX) were calculated according to animal body weight index (100 mg/kg for CE and F80; 2.5 mg/kg for MTX). Malignant tumor cells (sarcoma 180) from donor animals with 8 days of implanting were used. All animals were previously hygienized in an experimental surgery room. Donor mice were anaesthetized for tumor suctioning, and the ascitic form of the tumor was introduced under the right axilla of the receptor animals. Treatment, by *i.p.* route, began 24 h after tumor implantation for 7 days. The negative control group received only saline, and the standard group (positive) received MTX as referential antitumor drug. The animals were sacrificed on the eighth day, by cervical dislocation; solid tumors were excised and weighed. Tumor inhibition was expressed as the mean of tumor weight for the treated animal group (T) in comparison to the untreated control group (C). The tumor inhibition was then calculated according to percentage tumor inhibition = [(C – T)/C] × 100. Animal experiments were performed according to the NCI protocol [13].

**2.7. Anti-Inflammatory Assay—Carrageenan-Induced Peritonitis.** Saline (control); the standard drugs: dexamethasone, piroxicam, and indomethacin (2 mg/kg, 3 mg/kg, and 10 mg/kg, resp.); CE; F80 (100 mg/kg for both) were administered by oral route to the correspondent groups (6 animals per group). After one hour, 0.25 mL carrageenan (1% in 0.9% NaCl), intraperitoneally injected, was used as a phlogistic agent. Four hours later, animals were sacrificed by cervical dislocation, and immediately the abdomen was opened [15]. The peritoneal cavity was washed with 2 mL of saline containing 3 mM EDTA. Exudates were collected, and the polymorphonuclear leukocytes (PMNLs) counting was



performed in a Neubauer chamber after diluting the sample in Turk solution (0.01% crystal violet in 3% acetic acid).

**2.8. Nitrite Analysis.** Accumulated nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) in the peritoneal exudates was measured as an indicator of NO production according to a colorimetric assay based on Griess reaction [16]. The exudates (100  $\mu\text{L}$ ) were subjected to reaction with 100  $\mu\text{L}$  Griess reagent (6 mg/mL) at room temperature for 10 min, and then  $\text{NO}_2^-$  concentration was determined by measuring absorbance at 540 nm. A standard curve was constructed using known concentrations of sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ).

**2.9. Analgesic Activity—Acetic Acid-Induced Writhing Response.** The response to an i.p. injection of acetic acid solution exhibited as a contraction of the abdominal muscles and stretching of hind limbs was evaluated using a method adapted from Young et al. [17]. Animals (6 per group) were pretreated by i.p. with CE or F80 (100 mg/kg), vehicle (saline) or piroxicam (10 mg/kg), and dipyrene (150 mg/kg) as standard drugs. One hour later, a dose of 0.1 mL/10 g body weight of 1% acetic acid was injected via i.p. After 10 min, the number of writhings during the following 20 minute period was counted. Inhibition percentage was calculated through the decrease of total number of writhings in the treated groups against the control group.

**2.10. Statistical Analysis.** Data were expressed as mean  $\pm$  SEM and statistically assessed using one-way ANOVA (origin 5.0). *P* values less than 0.05 were considered significant.

### 3. Results and Discussion

Natural products, known as secondary metabolites of plants or animals, continue to be an important segment of research into new drugs. In fact, many compounds frequently used in chemotherapy, such as vincristine, taxol, and camptothecins, were isolated from plants or derived from natural prototypes [18–20].

Additionally, the search for new drugs that effectively interfere with the inflammatory process and pain is currently of great relevance; plants traditionally used as well as their derivative substances have historically been valued as a source of anti-inflammatory agents and pain killers [21, 22].

**3.1. Cytotoxicity.** The assays revealed that, at 50.0, 25.0, and 12.5  $\mu\text{g/mL}$ , F80 inhibited NCI-H292 cell growth by 25.6%, 14.3%, and 7.8%, respectively. A concentration of 6.25  $\mu\text{g/mL}$  and HEP-2 cell line induced no growth inhibition. CE did not show significant cytotoxic activity for either cell line.  $\text{IC}_{50}$  up to 50.0  $\mu\text{g/mL}$  used cell lines did not allow calculation of  $\text{IC}_{50}$ . Therefore, both extract and fraction presented low cytotoxicity.

Only F80 showed some cytotoxic activity; CE did not present cytotoxicity against the cell lines used. Several previous studies have demonstrated that plant extracts and derivative compounds have an anticancer potential *in vitro* or *in vivo*. Nakamura et al. [6] tested distinct *L. ferrea*

pod extracts using the *in vitro* Epstein-Barr virus early-antigen activation assay and found that the ethyl acetate extract exhibited the strongest inhibitory activity. Nozaki et al. [23], also working with *L. ferrea*, showed that paufferol, a compound obtained from the stem, possessed a cell proliferation inhibitory activity through the induction of apoptosis in human leukemia HL60 cells.

**3.2. Acute Oral Toxicity—LD<sub>50</sub> Determination.** The doses of 300 mg/kg and 2,000 mg/kg did not induce mice weight loss or death from either extract or fraction. LD<sub>50</sub> cutoff of CE and F80 was determined as 2,500 mg/kg body weight; both concentrations used were considered as safe (category 5) [14].

Despite widespread use (herbal medicine is applied by up to 80% of the population in developing countries), few scientific studies have been undertaken to ascertain the safety and efficacy of traditional remedies [24]. The present investigation suggests that the aqueous extract of *L. ferrea* pods is practically nontoxic via oral route in mice using an acute single dose, indicating that the popular use of this kind of extract can be considered secure.

**3.3. Antitumor Activity.** F80 showed a tumor growth inhibition of 8.68%, but this value is not significant when compared with the control group. CE did not reveal antitumor activity (Figure 1); CE and F80 did not reduce tumor weight significantly. However, Nakamura et al. [8] isolated two constituents (gallic acid and methyl gallate) from *L. ferrea* pod and tested them against skin carcinogenesis in mice, finding a reduction in the average number of papillomas per mouse. Studying another *Caesalpinia* species, *C. bonducella*, Gupta et al. [18] evaluated the antitumor effect of methanol leaf extract against Ehrlich ascites carcinoma in mice; the extract promoted a significant increase of mean survival time of mice and a decrease of tumor volume, when compared with control group. Then, the antitumor effect of *Caesalpinia* spp. may vary according to extract (and/or isolated constituents) and tumor types used.

**3.4. Anti-Inflammatory Assay.** CE and F80 exhibited anti-inflammatory activity, reducing cell migration. CE and F80 showed significant reduction (40.9% and 38.2%, resp.) in the number of PMNL in the inflammatory exudate, similar to piroxicam (46.7%) (Figure 2 and Table 1).

Among the phlogistic agents available (such as dextran, bradykinin,  $\beta$ -glucan, etc.), carrageenan is perhaps the most commonly used and well studied [25] producing a maximal edema in 3 h. While the carrageenan model is typically associated with activation of the cyclooxygenase pathway and is sensitive to glucocorticoids and prostaglandin synthesis antagonists, the early phase of the carrageenan response is due to the release of serotonin and histamine [26]. Thus, the significant ameliorative activity of CE and F80 observed in the present study may be due to inhibition of inflammatory mediators such as histamine, serotonin, and prostaglandin and also due to a decrease in NO production.

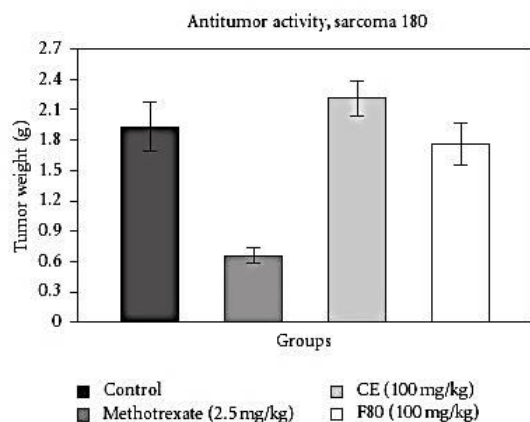


FIGURE 1: Effects of MTX (methotrexate), CE, and F80 on the growth of sarcoma 180 in Swiss albino male mice. Each column represents the mean of six animals, and vertical lines show the SEM. The asterisk denotes the significance level in comparison to the control value: \* $P < 0.05$ .

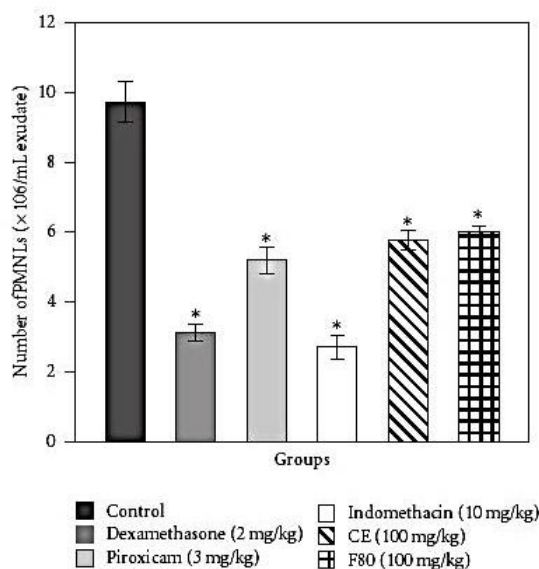


FIGURE 2: Effect of pretreatment with dexamethasone, piroxicam, indomethacin (standard drugs), CE, and F80 on migration of polymorphonuclear leukocytes (PMNLs) (number of PMNLs/mL exudate) in carrageenan-induced peritonitis in mice. Each column represents the mean of six animals, and vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance level in comparison to the control value: \* $P < 0.05$ .

According to Kelly et al. [27], there is a growing optimism that inhibition of leukocyte recruitment might prevent inappropriate inflammation. So, the search for drugs that act upon cell migration may be of great interest. Our study is unprecedented, since no other study has related the CE and F80 effects on cell migration.

TABLE 1: Evaluation of anti-inflammatory activity of standard drugs (dexamethasone, piroxicam and indomethacin), CE, and F80 on carrageenan-induced peritonitis in pretreated mice.

Compound	PMNL/mL exudate $\pm$ SEM ( $\times 10^6$ )	Anti-inflammatory activity (%)
Control	9.7 $\pm$ 0.8	—
Dexamethasone (2 mg/kg)	3.1 $\pm$ 0.3*	68.1
Piroxicam (3 mg/kg)	5.2 $\pm$ 0.5*	46.7
Indomethacin (10 mg/kg)	2.7 $\pm$ 0.4*	72.2
CE (100 mg/kg)	5.8 $\pm$ 0.3*	40.9
F80 (100 mg/kg)	6.0 $\pm$ 0.1*	38.2

$n = 6$ . \* $P < 0.05$  versus the control group.

In a previous approach, Carvalho et al. [28] determined the anti-inflammatory activity of a crude aqueous extract of *L. ferrea* pods at 60°C, using the carrageenan-induced paw edema method in mice. Assays revealed that the extract reduced the edema formation significantly from the first moments.

Several plant extracts present expressive anti-inflammatory activity by reducing leukocyte migration. Matos et al. [29], using the same experimental model applied in the present study, also observed a decrease in cell migration in mice treated with an aqueous fraction obtained from a leaf ethanolic extract of *Spiranthera odoratissima*. Gokhale et al. [30] working with ethanolic extracts from *Saussurea lappa*, *Argyrea speciosa*, and *Achyranthes aspera* discovered that all of them show anti-inflammatory activity using the carrageenan-induced paw edema and carrageenan-induced peritonitis models in rats and mice.

**3.5. Nitrite Analysis.** The nitrite content in the exudates was quantified using Griess reagent since nitric oxide (NO) synthesis by inducible nitric oxide synthase (iNOS) is increased in inflammation and leads to cellular injury. This assay is an indirect method to quantify NO, which rapidly reduces to nitrate and nitrite.

Nitric oxide derived from iNOS is involved in various pathological conditions such as inflammation and autoimmune diseases leading to tissue damage [31]. Thus, suppression of iNOS is closely linked with anti-inflammatory action [32].

CE and F80 promoted a high reduction in the content of nitrite, especially CE, which decreased it to a level smaller than those presented by the standard drugs, as shown in Figure 3. The strong reduction by CE of nitrite level in the exudate might be attributed to the presence of antioxidant compounds in this aqueous extract. It is likely that CE and F80 show their anti-inflammatory activity through the downregulation of NO production and reduction in leukocyte migration.

Plant extracts showing immunomodulatory activities have been extensively described, especially for their inhibitory effect upon the NO production by macrophages [33, 34]. Ahn et al. [32], investigating the ethanol extract



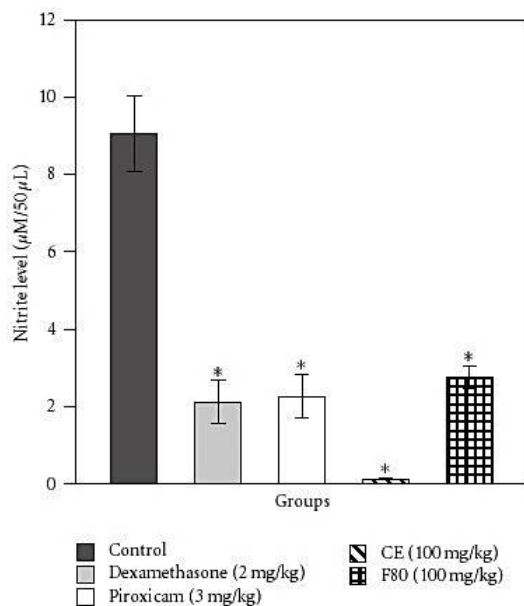


FIGURE 3: Inhibitory effects of the standard drugs, dexamethasone and piroxicam, CE, and F80 in relation to the control group for NO production. Each column represents the mean of six animals, and vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance level in comparison to the control value: \* $P < 0.05$ .

and fractions of *Gastrodia elata* rhizomes, discovered that the extract and its *n*-butanol fraction decreased the nitrite content in the exudates obtained from the carrageenan-induced air-pouch model in mice. Koo et al. [35] also verified this reduction by testing two constituents (geniposide and genipin) obtained from the ethanol extract of *Gardenia jasminoides* fruit in rats.

**3.6. Analgesic Activity—Acetic Acid-Induced Writhing Response.** There are different routes to evaluate nociception; however, the assay using intraperitoneally acetic acid was the chosen approach. The animals were pretreated one hour before administration of phlogistic agent, then apparently, there was no influence of the administration effect. Other authors have also used parenteral route in their researches [36, 37].

It is well known that the intraperitoneal administration of agents that irritate serous membranes, such as acetic acid, causes a stereotypical behavior in mice characterized by abdominal contractions, movements of the body as a whole, twisting of dorsoabdominal muscles, and a decrease in motor activity and coordination [38]. Using the acetic acid-induced writhing response, which is the visceral pain model, the analgesic mechanism of abdominal writhing involves different nociceptive mechanisms, such as the process or release of arachidonic acid metabolites via cyclooxygenase and prostaglandin biosynthesis, opioid mechanisms, local peritoneal receptors and mediators related to acetylcholine and histamine, and sympathetic system mediators [35, 39, 40].

TABLE 2: Antinociceptive effect of standard drugs (piroxicam and dipyrone), CE, and F80 on acetic acid-induced writhing response test in mice.

Compound	Dose	Medium $\pm$ SEM	Protection (%)
Control	—	69.1 $\pm$ 7.8	—
Piroxicam	10 mg/kg	46.5 $\pm$ 1.6*	32.73
Dipyrone	150 mg/kg	18.2 $\pm$ 1.9*	73.60
CE	100 mg/kg	30.0 $\pm$ 4.0*	56.60
F80	100 mg/kg	18.9 $\pm$ 1.9*	72.72

$n = 6$ . \* $P < 0.05$  versus the control group.

Acetic acid causes algia by releasing endogenous substances, which then excite the pain nerve endings; the abdominal constriction is related to sensitization of nociceptive receptors to prostaglandins [41]. Although this assay is nonspecific (e.g., anticholinergic, antihistaminic, and other agents also show activity), it is a very sensitive procedure that enables the detection of peripheral antinociceptive activity of compounds using animal protocols and is widely used for analgesic screening. This method is simple and reliable and affords rapid evaluation of peripheral analgesic action [42].

Dipyrone (metamizol) is a widely used nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID). In addition to the well-known peripheral effects of NSAIDs—especially prostaglandin synthesis inhibition—and the fact that dipyrone is able to induce a significant antinociceptive effect in the absence of an anti-inflammatory response, it has been proposed that it produces antinociception at least partially by acting upon central nervous system structures [43, 44].

Since CE and F80 were confirmed to have anti-inflammatory activity in carrageenan-induced peritonitis (Figure 2 and Table 1), their analgesic activity was examined. As shown in Table 2 and Figure 4, both preparations protected mice against chemically induced noxious stimulus, causing an inhibition at the rate of 56.6% (for CE, higher than that promoted by piroxicam) and 72.7% (for F80, comparable to dipyrone) on the writhing response induced by acetic acid. These results indicate that CE and F80 showed analgesic action in addition to anti-inflammatory activity. Subsequently, it suggests that prostaglandin biosynthesis might be commonly involved in both activities of CE and F80 or that the mode of action of both preparations is related to sensitization of nociceptive receptors to prostaglandins.

Carvalho et al. [28] also evaluated the analgesic activity of an *L. ferrea* pod extract, using a variation of the method described here and the hot-plate test in mice. Our results corroborate theirs, both showing significant reduction in nociception in treated groups.

#### 4. Conclusions

CE and F80 have neither significant cytotoxic nor antitumor activities over NCI-H292 and HEP-2 cell lines or the solid tumor (sarcoma 180) assayed. However, further studies are necessary to evaluate these activities using other cell lines and tumors to elucidate whether these preparations are effective

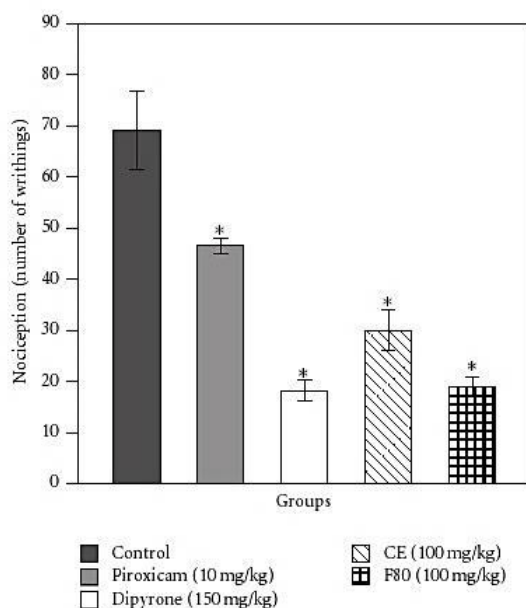


FIGURE 4: Effects of the standard drugs, piroxicam and dipyron, CE, and F80 in relation to the control group on writhing induced in mice by intraperitoneal injection of acetic acid. Each column represents the mean of six animals, and vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance level in comparison to the control value: \* $P < 0.05$ .

against any of them, as this plant is used popularly for cancer prevention. On the other hand, their low toxicity allows the use of CE and F80 with a degree of safety in other situations. Furthermore, the antinociceptive and anti-inflammatory effects demonstrated in the present study contributed to the ethnomedical uses of *L. ferrea*. Further investigations are necessary to elucidate the precise mechanisms of action and the compounds responsible for these effects.

### Acknowledgments

This work was financially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors are also grateful for the technical assistance of Mrs. Maria Barbosa Reis da Silva and Mr. João Virgínio. Scott V. Heald, North American teacher at CIEC, bilingual school, is acknowledged for English review.

### References

- [1] *The International Plant Names Index*, 2009, <http://www.ipni.org/>.
- [2] L. A. R. Bragança, *Plantas Mediciniais Antidiabéticas*, EDUFF Press, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil, 1996.
- [3] H. Lorenzi, *Árvores Brasileiras Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*, Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, São Paulo, Brasil, 4th edition, 2002.

### Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

- [4] A. Balbach, *As Plantas que Curam*, Três, São Paulo, Brasil, 1972.
- [5] G. Hashimoto, Ed., *Illustrated Cyclopedic of Brazilian Medicinal Plants*, Aboc-sha, Kamakura, Japan, 1996.
- [6] E. L. S. Nakamura, F. Kurosaki, M. Arisawa et al., "Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds," *Cancer Letters*, vol. 177, no. 2, pp. 119–124, 2002.
- [7] M. Gomes, *As Plantas da Saúde—Guia de Tratamentos Naturais*, Paulinas, São Paulo, Brazil, 3rd edition, 2003.
- [8] E. L. S. Nakamura, F. Kurosaki, M. Arisawa et al., "Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 81, no. 1, pp. 135–137, 2002.
- [9] E. C. Pereira, S. C. Nascimento, R. C. Lima et al., "Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity," *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, vol. 19, no. 1-2, pp. 47–52, 1994.
- [10] M. C. Alley, D. A. Scudiero, A. Monks et al., "Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay," *Cancer Research*, vol. 48, no. 3, pp. 589–601, 1988.
- [11] S. F. Slater, R. Sawter, and U. Strauli, "Studies on succinate-tetrazolium reductase system—III. Points of coupling of different tetrazolium salts," *Biochemical et Biophysica Acta*, vol. 77, pp. 383–393, 1963.
- [12] R. Hess and A. G. E. Pearse, "Pathways of reduced pyridine nucleotide oxidation in rat-brain homogenate demonstrated by a tetrazolium method," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 71, pp. 285–294, 1963.
- [13] R. I. Geran, N. H. Greenber, M. M. Macdonald, R. I. Schumacher, and B. J. Abbott, "Protocols for screening chemical agents and natural-products against tumors and other biological systems," *Cancer Chemotherapy Reports*, vol. 2, no. 3, part 3, 1972.
- [14] OECD-Organization for Economic Cooperation and Development, *OECD Guideline for Testing of Chemicals*, Guideline 423: Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method, 2001.
- [15] M. Gupta, U. K. Mazumder, R. Sambath Kumar et al., "Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 98, no. 3, pp. 267–273, 2005.
- [16] M. P. Sherman, E. E. Aeberhard, V. Z. Wong, J. M. Griscavage, and L. J. Ignarro, "Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 191, no. 3, pp. 1301–1308, 1993.
- [17] H. Y. Young, Y. L. Luo, H. Y. Cheng, W. C. Hsieh, J. C. Liao, and W. H. Peng, "Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 96, no. 1-2, pp. 207–210, 2005.
- [18] M. Gupta, U. K. Mazumder, R. S. Kumar, T. Sivakumar, and M. L. M. Vamsi, "Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice," *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 94, no. 2, pp. 177–184, 2004.
- [19] R. van der Heijden, D. I. Jacobs, W. Snoeijer, D. Hallard, and R. Verpoorte, "The *Catharanthus alkaloids*: pharmacognosy and biotechnology," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 11, no. 5, pp. 607–628, 2004.
- [20] L. V. Costa-Lotufo, M. T. H. Khan, A. Ather et al., "Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 99, no. 1, pp. 21–30, 2005.



- [21] E. Elisabetsky, T. A. Arnador, R. R. Albuquerque, D. S. Nunes, and A. Do CT Carvalho, "Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. and S.) Muell. Arg. alkaloids," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 48, no. 2, pp. 77–83, 1995.
- [22] J. B. Calixto, M. M. Campos, M. F. Otuki, and A. R. S. Santos, "Anti-inflammatory compounds of plant origin—part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules," *Planta Medica*, vol. 70, no. 2, pp. 93–103, 2004.
- [23] H. Nozaki, K. I. Hayashi, M. Kido et al., "Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity," *Tetrahedron Letters*, vol. 48, no. 47, pp. 8290–8292, 2007.
- [24] A. Veerappan, S. Miyazaki, M. Kadarkaraisamy, and D. Ranganathan, "Acute and subacute toxicity studies of *Aegle marmelos* Corr., an Indian medicinal plant," *Phytomedicine*, vol. 14, no. 2-3, pp. 209–215, 2007.
- [25] J. Garcia Leme, L. Hamamura, M. P. Leite, and M. Rocha e Silva, "Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating," *British Journal of Pharmacology*, vol. 48, no. 1, pp. 88–96, 1973.
- [26] M. Di Rosa, J. P. Giroud, and D. A. Willoughby, "Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine," *Journal of Pathology*, vol. 104, no. 1, pp. 15–29, 1971.
- [27] M. Kelly, J. M. Hwang, and P. Kubes, "Modulating leukocyte recruitment in inflammation," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 120, no. 1, pp. 3–10, 2007.
- [28] J. C. T. Carvalho, J. R. M. Teixeira, P. J. C. Souza, J. K. Bastos, D. Dos Santos Filho, and S. J. Sarti, "Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 53, no. 3, pp. 175–178, 1996.
- [29] L. G. Matos, L. D. A. R. Santos, C. F. Vilela et al., "Atividades analgésica e/ou antiinflamatória da fração aquosa do extrato etanólico das folhas da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá)," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 13, supplement, pp. 15–16, 2003.
- [30] A. B. Gokhale, A. S. Damre, K. R. Kulkarni, and M. N. Saraf, "Preliminary evaluation of anti-inflammatory and antiarthritic activity of *S. lappa*, *A. speciosa* and *A. aspera*," *Phytomedicine*, vol. 9, no. 5, pp. 433–437, 2002.
- [31] V. K. Singh, S. Mehrotra, P. Narayan, C. M. Pandey, and S. S. Agarwal, "Modulation of autoimmune diseases by nitric oxide," *Immunologic Research*, vol. 22, no. 1, pp. 1–19, 2000.
- [32] E. K. Ahn, H. J. Jeon, E. J. Lim, H. J. Jung, and E. H. Park, "Anti-inflammatory and anti-angiogenic activities of *Gastrodia elata* Blume," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 110, no. 3, pp. 476–482, 2007.
- [33] G. Rimbach, Y. C. Park, Q. Guo et al., "Nitric oxide synthesis and TNF- $\alpha$  secretion in RAW 264.7 macrophages mode of action of a fermented papaya preparation," *Life Sciences*, vol. 67, no. 6, pp. 679–694, 2000.
- [34] J. H. Ryu, H. Ahn, J. Y. Kim, and Y. K. Kim, "Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages," *Phytotherapy Research*, vol. 17, no. 5, pp. 485–489, 2003.
- [35] H. J. Koo, K. H. Lim, H. J. Jung, and E. H. Park, "Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 103, no. 3, pp. 496–500, 2006.
- [36] E. Woode and W. K. Abotsi, "Antinociceptive effect of an ethanolic extract of the aerial parts of *Hillieria latifolia* (Lam.) H. Walt. (Phytolaccaceae)," *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, vol. 3, no. 3, pp. 384–396, 2011.
- [37] P. Li and S. Zhu, "Mutational analysis of the analgesic peptide DrTx(1–42) revealing a functional role of the amino-terminal turn," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, article e31830, 2012.
- [38] D. Le Bars, M. Gozariu, and S. W. Cadden, "Animal models of nociception," *Pharmacological Reviews*, vol. 53, no. 4, pp. 597–652, 2001.
- [39] H. O. Collier, L. C. Dinneen, C. A. Johnson, and C. Schneider, "The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse," *British Journal of Pharmacology*, vol. 32, no. 2, pp. 295–310, 1968.
- [40] Y. M. Park, J. H. Won, Y. H. Kim, J. W. Choi, H. J. Park, and K. T. Lee, "In vivo and in vitro anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 101, no. 1–3, pp. 120–128, 2005.
- [41] Q. Chen, *Methodology in Pharmacological Study on Chinese Materia Medica*, 7 People's Medical Publishing House, Beijing, China, 1993.
- [42] U. A. Shinde, A. S. Phadke, A. M. Nair, A. A. Mungantiwar, V. J. Dikshit, and M. N. Saraf, "Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. wood oil," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 65, no. 1, pp. 21–27, 1999.
- [43] N. Hernández and H. Vanegas, "Antinociception induced by PAG-microinjected dipyrone (metamizol) in rats: involvement of spinal endogenous opioids," *Brain Research*, vol. 896, no. 1–2, pp. 175–178, 2001.
- [44] G. P. Hernández-Delgado and S. L. Cruz, "Dipyrone potentiates morphine-induced antinociception in dipyrone-treated and morphine-tolerant rats," *European Journal of Pharmacology*, vol. 502, no. 1–2, pp. 67–73, 2004.

**6 APÊNDICE C - CAPÍTULO III**

**TOXICITY OF THREE LECTINS FROM *Libidibia (Caesalpinia)*  
*ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz AGAINST *Artemia*  
*salina* Leach AND *Biomphalaria glabrata* Say**

Artigo a ser publicado no periódico **Bioresource Technology** (IF: 4.980)

**TOXICITY OF THREE LECTINS FROM *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz AGAINST *Artemia salina* Leach AND *Biomphalaria glabrata* Say**

A. C. C. Freitas <sup>a</sup>, M. C. Ramos <sup>a</sup>, L. R. S. Silva <sup>b</sup>, T. H. Napoleão <sup>a</sup>, W. N. Siqueira <sup>b</sup>, S. N. Silva <sup>a</sup>, N. C. A. Ximenes <sup>a</sup>, M. G. Carneiro-da-Cunha <sup>a</sup>, A. M. M. A. Melo <sup>b</sup>, M. T. S. Correia <sup>a</sup>, M. L. V. Oliva <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Radiobiologia, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, Rua Três de maio, nº 100, Vila Clementino 04044-020, São Paulo, SP – Brazil

Corresponding author: M. T. S. Correia, e-mail address: terezacorreia.ufpe@gmail.com

***Abstract***

*Libidibia ferrea* var. *parvifolia* is a tree largely distributed in Brazil, presenting various ethnomedical uses, for treatment of many diseases and symptoms. This study aimed the evaluation of artemicidal and embriotoxic activities of three lectins, CfePL, CfeLL and CfeBL, purified from pods, leaves and bark of *L. ferrea*, respectively, against *Artemia salina* and *Biomphalaria glabrata*. Different concentrations for each lectin were tested (100; 50; 25 and 12.5 ppm). Regarding to artemicidal activity, all lectins tested

promoted the death of *A. salina*. LC<sub>50</sub> of CfeLL, CfeBL and CfePL were 10.728; 25.78 and 54.18 ppm, respectively. Only CfeLL and CfePL showed embryotoxic activity at the concentrations tested, with LC<sub>50</sub> of 36.30 and 94.95 ppm, respectively. CfeLL and CfeBL showed interesting results in artemicidal activity. CfeLL also presented a significant molluscicidal activity, requiring further investigations.

**Keywords:** Lectins; *Libidibia ferrea*; *Artemia salina*; *Biomphalaria glabrata*

### **Introduction**

In order to establish the toxicity of new natural products, various assays can be used, as the lethality assay with the brine shrimp *Artemia salina*, which was developed to detect bioactive compounds in plant extracts (Silva Filho et al., 2005).

Lectins constitute a class of proteins or glycoproteins which possess at least one noncatalytic domain capable of specific recognition and reversible binding to carbohydrate and without immunological characteristics (Sharon and Lis, 2001; Gabius et al., 2011). They have attracted great interest because of their various biological activities and are considered valuable tools in the field of Genetics, Immunology and Biomedicine (Díaz et al., 1999).

Analyses at the level of the genome and the transcriptome have shown that lectin sequences are ubiquitous in the plant kingdom and hundreds of lectins have already been purified from various plant species (Van Damme et al., 2008).

*Libidibia ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz (Leguminosae), whose basionym is *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. (Caesalpinaceae) (The International Plant Names Index, 2009), is a tree that grows throughout Brazil,



especially in the north and northeast regions (Bragança, 1996; Lorenzi, 2002). It is used popularly for treatment of many diseases and symptoms.

In view of its ethnomedicinal importance, the Brazilian Ministry of Health has included this species on the National List of Medicinal Plants important to the Health System (Vasconcelos et al., 2011).

From this species, three chitin-binding lectins have been purified: CfePL (*Caesalpinia ferrea* Pod Lectin), CfeBL (*Caesalpinia ferrea* Bark Lectin) and CfeLL (*Caesalpinia ferrea* Leaf Lectin).

The specific objective of the present study was to examine CfePL, CfeBL and CfeLL for their embriotoxic activity against the snail *Biomphalaria glabrata* and their general toxicity towards *Artemia salina*.

## ***Materials and Methods***

### **Plant Material**

*L. ferrea* pods, leaves and bark were collected from Ibimirim City, State of Pernambuco, Northeastern Brazil, in November, 2009, and identified by A. Bocage. A sample of the collected material is archived as voucher specimen number 83566, IPA, at the herbarium “Dárdano de Andrade Lima” (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Brazil).

### **Lectins purification**

#### **CfePL and CfeBL**

*L. ferrea* pods and bark were washed separately with distilled water, dried at room temperature and powdered in a multiprocessor. Crude, aqueous extracts were

prepared using each pod and bark powder in 0.9% NaCl (10% w/v) by gentle shaking for 16 h, at 4°C, passed through gauze and centrifuged (10000×g) for 15 min. Thereafter, proteins of pod and bark extracts were precipitated over 4 h by 0–80% ammonium sulphate fractionation at room temperature; resuspended precipitates were dialyzed against distilled water followed by 0.9% NaCl (F80). A sample of each fraction was incubated (30 min) with chitin pre-equilibrated with 0.15 M NaCl, applied to chromatographic columns (5.0 x 1.5 cm) and proteins of each fraction were measured by absorbance at 280 nm. Unbound proteins were eluted with NaCl and adsorbed proteins were eluted with 1.0 M acetic acid. Fractions with high activity, eluted with acetic acid were bulked, dialyzed against distilled water obtaining CfePL and CfeBL, which were stored at -20 °C.

### **CfeLL**

*L. ferrea* leaves were dried at room temperature and powdered in a multiprocessor. A crude, aqueous extract was prepared using this powder in 10 mM pH 6.5 citrate phosphate buffer (10% w/v) by gentle shaking for 16 h, at room temperature, centrifuged (8000×g) for 15 min, and filtered. Precipitate was discarded. A sample of the supernatant was incubated (30 min) with chitin pre-equilibrated with 10 mM pH 6.5 citrate phosphate buffer, applied to a chromatographic column (5.0 x 1.5 cm) and proteins of each fraction were measured by absorbance at 280 nm. Unbound proteins were eluted with 10 mM pH 6.5 citrate phosphate buffer and adsorbed proteins were eluted with 1.0 M acetic acid. Fractions with high activity, eluted with acetic acid were bulked, dialyzed against distilled water obtaining CfeLL, which was stored at -20 °C.

### **Haemagglutination assay and protein quantification**

Fresh erythrocytes from rabbit were obtained and glutaraldehyde treated. Lectins haemagglutinating activity (HA) was defined as the lowest sample dilution showing haemagglutination; specific HA (SHA) corresponding to HA divided by the protein concentration (Correia and Coelho, 1995). Quantitative protein determination (mg/mL) was performed according to Peterson (1983), using the formula:  $y = (1.55 \times \text{Abs } 280 \text{ nm}) - (0.76 \times \text{Abs } 260 \text{ nm})$ .

### **Toxicity against *Artemia salina***

The brine shrimp lethality bioassay was performed following the reported procedure (Meyer et al., 1982), with minor modifications. The growth medium was prepared with sea water (pH 8.0). After 48 h the shrimps are mature as nauplii and ready for the assay. The tests were performed with different concentrations of lectins (100; 50; 25 and 12.5 ppm) in falcon tubes containing 10 animals each. The exposure occurred for 24 h. After this period the number of dead nauplii and survivors was determined. The experiments were performed in quadruplicate.

### **Toxicity against *Biomphalaria glabrata* embryos**

Embryos of *B. glabrata* were separated into groups of 100 individuals and placed in Petri dishes to carry out exposure of lectin samples at different concentrations (100; 50; 25 and 12.5 ppm) for 24 h. After this period, the embryos were rinsed with filtered water, to remove the residual samples. Then embryos were placed in 24-well cell culture plates for observation of the following parameters: mortality, malformations, and outbreak. This analysis was performed for 7 consecutive days

(Okazaki et al., 1996). Throughout the experiment the plates were kept in an incubator for biochemical oxygen demand at 25 ° C and 12 h photoperiod. These experiments were performed in triplicate.

### **Statistical analysis**

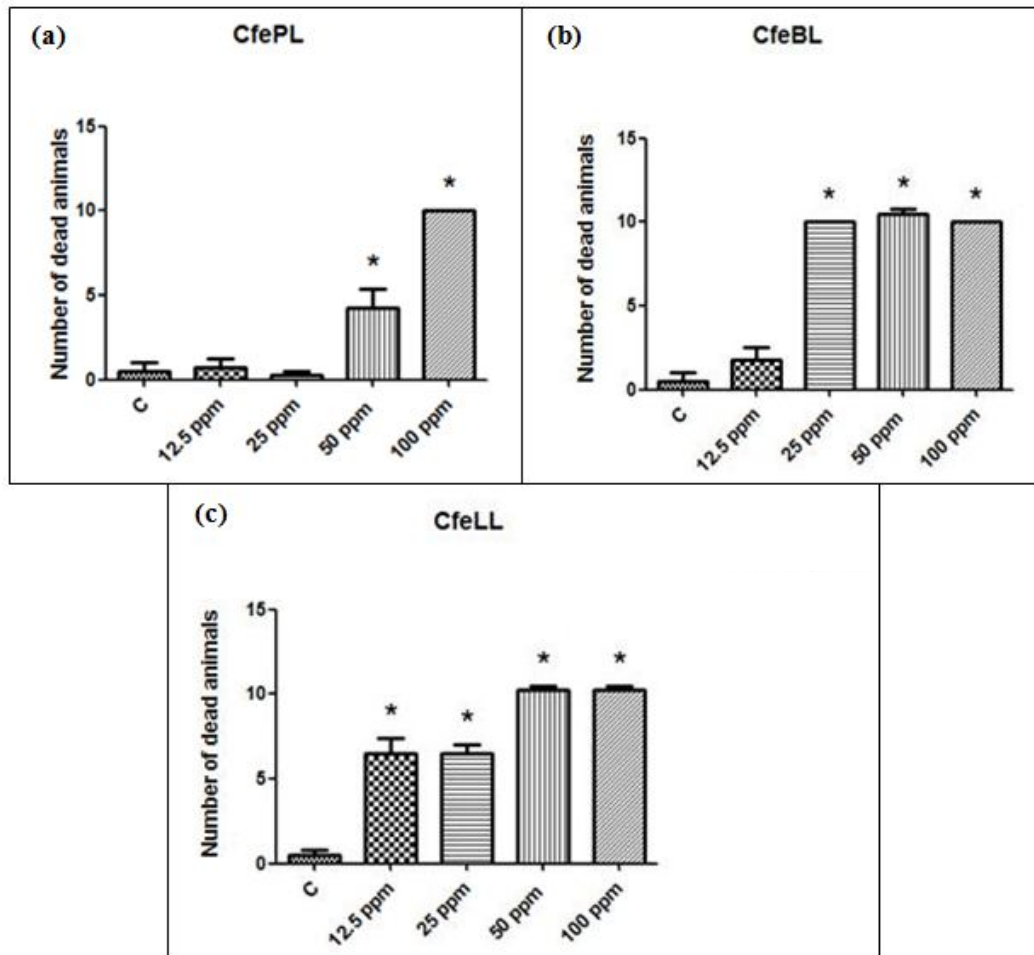
Data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (standard error medium) and statistically assessed using one-way ANOVA, Newman-Keuls Multiple Comparison Test and Probit analysis (Statplus 2006, AnalystSoft, Canada). P values less than 0.05 were considered significant.

## **Results and Discussion**

### **Toxicity against *A. salina***

Legume lectins show similar chemical, physicochemical and structural characteristics and become important biological tools due to the fact that they show variations in some biological activities, in spite of their high homology (Santos et al., 2010).

Regarding to artemicidal activity, all lectins tested promoted the death of *A. salina*, as seen in **Figure 1**. However, early as the concentration of 12.5 ppm (12.5  $\mu$ g/mL), CfeLL was the most active lectin tested, whereas CfeBL and CfePL showed significative artemicidal activity only at the concentrations of 25 ppm and 50 ppm, respectively. At the concentration of 100 ppm, the three lectins promoted death of all animals.



**Figure 1** – Artemicidal activity of CfePL (a), CfeBL (b) and CfeLL (c) at different concentrations. Vertical lines show the S.E.M. and asterisks denote the significance level in comparison to the control value: \* $P < 0.05$ .

LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> and LC<sub>100</sub> of CfePL, CfeBL and CfeLL were also calculated. Data are shown in **Table 1**.

**Table 1** – Artemicidal activity of CfePL, CfeBL and CfeLL.

Lectin	Lethal concentrations (ppm)		
	LC <sub>10</sub>	LC <sub>50</sub>	LC <sub>100</sub>
CfePL	13.53	54.18	101.76
CfeBL	—	25.78	65.30
CfeLL	—	10.73	60.17

LC values were calculated by probit analysis with significance level of  $p < 0.05$ . Standard errors for LC<sub>50</sub> of CfePL, CfeBL and CfeLL were 7.00, 5.12 and 3.37, respectively. — Not calculated.

The lethality assay of *A. salina* showed good correlation with the issue of general cytotoxicity against several human solid tumors and pesticide activity (Anderson et al., 1991; Mclaughlin et al., 1991; Ramachandran et al., 2011). Furthermore, it can be used to express the toxicity of a compound with molluscicidal activity against non-target organisms such as small crustaceans and fish (Lima et al. 2002).

Meyer et al. (1982) established a relationship between the degree of toxicity and the median lethal dose, LC<sub>50</sub>, on larvae of *A. salina*. Crude extracts and pure substances with LC<sub>50</sub> value  $< 1000 \mu\text{g/mL}$  (1000 ppm) are considered toxic.

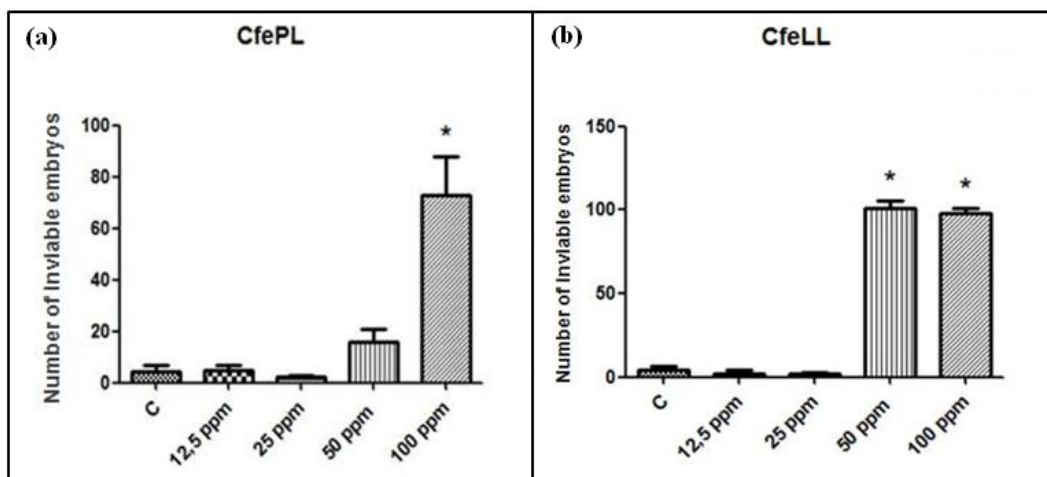
Besides the research with plant extracts, many other lectins have been tested, with promising results. Working with five glucose/manose binding lectins, Santos et al. (2010) discovered that, for the brine shrimp (*A. salina*), the most active lectins came from *Cratylia floribunda* (CFL), *Dioclea guianensis* (Dgui), *D. grandiflora* (DGL) and *D. virgata* (Dvir) with LC<sub>50</sub> and (LC<sub>90</sub>) values of 4.75  $\mu\text{g/mL}$  (7.68  $\mu\text{g/mL}$ ), 5.21  $\mu\text{g/mL}$  (11.3  $\mu\text{g/mL}$ ), 2.52  $\mu\text{g/mL}$  (5.02  $\mu\text{g/mL}$ ) and 2.77  $\mu\text{g/mL}$  (19.9  $\mu\text{g/mL}$ ), respectively. The LC<sub>50</sub> values of SLL-1, SLL-2 and SLL-3, lectins obtained from *Moringa oleifera* seeds, were found to be 15.8, 17.78 and 14.12  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The experimental results revealed that SLL-3 is more cytotoxic than other lectins (Khatun et al., 2009). On the other hand, the lectin obtained from *Sebastiania*

*jacobinensis* (SejaBL) showed percentage deaths of *A. salina* with LC<sub>50</sub> of  $715.89 \pm 1$   $\mu\text{g/mL}$ , meaning that SejaBL contains low environmental toxicity (Vaz et al., 2010).

### Toxicity against *B. glabrata*

Only CfePL and CfeLL showed embryotoxic activity at the concentrations tested (**Figure 2**). The results obtained with CfeBL do not differ statistically when compared to control. CfeLL was most active than CfePL since has almost 100% *B. glabrata* embryos infeasible already at concentration of 50 ppm, while CfePL only prevented it at a concentration exceeding 100 ppm.

LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> and LC<sub>100</sub> of CfePL and CfeLL were also calculated. Data are shown in **Table 2**.



**Figure 2** – Embryotoxic activity of CfePL (a) and CfeLL (b) at different concentrations against *B. glabrata*. Vertical lines show the S.E.M. and asterisks denote the significance level in comparison to the control value: \*P < 0.05.

**Table 2** – Molluscicidal activity of CfePL, CfeBL and CfeLL against *B. glabrata* embryos.

Lectin	Lethal concentrations (ppm)		
	LC <sub>10</sub>	LC <sub>50</sub>	LC <sub>100</sub>
CfePL	30.96	94.95	169.83
CfeBL	—	—	—
CfeLL	28.98	36.30	58.07

LC values were calculated by probit analysis with significance level of  $p < 0.05$ . Standard errors for LC<sub>50</sub> of CfePL and CfeLL were 5.03 and 1.70, respectively.

This test takes into account the number of viable embryos, which includes parameters such as mortality, malformation and hatching. According to Oliveira-Filho et al. (2010), although being alive, malformed embryos seldom successfully hatch and, even if they do, hatching delay itself may impair post-hatching growth and survival thereby contributing to the reduction of snail population in an infested body of water. The three outcomes of a substance-induced embryotoxicity, therefore, apparently contribute to reducing the viability of molluscicide-exposed egg masses.

According to these results, only CfeLL fell below the threshold of 100  $\mu\text{g/mL}$  set for potential molluscicidal activity by the World Health Organization (WHO, 1965).

Several plant species have been proved to have molluscicidal properties against different snail species, including natural compounds of the Leguminosae family (Farnsworth et al., 1987; Adetunji; Salawu, 2010; Cantanhede et al., 2010).

Santos et al. (2012), examining extracts of eight plants used by the Pankararé indigenous people for medicinal purposes, discovered that *Poincianella pyramidalis* (LC<sub>50</sub> 0.94 mg/L), *Chenopodium ambrosoides* (LC<sub>50</sub> 13.51 mg/L), *Mimosa tenuiflora* (LC<sub>50</sub> 20.22 mg/L), *Hyptis pectinata* (LC<sub>50</sub> 25.55 mg/L), and *Jatropha molissima* (LC<sub>50</sub> 33.55 mg/L) demonstrated the strongest molluscicidal activities.



Lectins have also been tested regarding to their molluscicidal effects. Lectins CFL and Dgui showed significant molluscicidal activity, with values of  $LC_{90} = 50.3 \mu\text{g/mL}$  and  $LC_{90} = 41.0 \mu\text{g/mL}$ , respectively (Santos et al., 2010). On the other hand, SejaBL did not present toxicity in blastulae and embryo development of *B. glabrata* (Vaz et al., 2010).

### ***Conclusions***

The results of artemicidal activity displayed by CfeLL and CfeBL, besides the significant molluscicidal activity of CfeLL demonstrate their potential biotechnological applications, although the high CfeLL toxicity revealed by the brine shrimp test emphasizes the general need to determine the effects of all potential molluscicides on non-target organisms. Further investigations are necessary to discover the action mechanism of these lectins.

### ***Acknowledgments***

This work was financially supported by the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors are also grateful for the technical assistance of Mrs. Maria Barbosa Reis da Silva and Mr. João Virgínio. Scott V. Heald, North American teacher at CIEC, bilingual school, is acknowledged for English review.

### References

1. Adetunji, V.O., Salawu, O.T., 2010. Efficacy of ethanolic leaf extracts of *Carica papaya* and *Terminalia catappa* as molluscicides against the snail intermediate hosts of schistosomiasis. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(22), 2348-2352.
2. Anderson, J.E.; Goetz, C.M.; McLaughlin, J.L.; Suffiness, M., 1991. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor pre-screens. *Phytochem. Anal.* 2, 107-111.
3. Bragança, L.A.R., 1996. *Plantas Medicinai Antidiabéticas*, EDUFF Press, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.
4. Cantanhede, S.P.D., Marques, A.M., Silva-Souza, N.; Valverde, A.L., 2010. Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática. *Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20(2), 282-288.
5. Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 1995. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 55, 261-273.
6. Díaz, P.H., González, O.M., Vélez, Y.R.P., Báez, C.F.A.G., 1999. Aplicaciones de las lectinas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 15(2), 91-95.

7. Farnsworth, N.R., Henderson, T.O., Soejarto, D.D., 1987. Plants with potential molluscicidal activity, in: Mott, K.E. (Ed.), *Plant Molluscicides*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK, pp. 131-204.
8. Gabius, H.J., André, S., Jiménez-Barbero, J., Romero, A., Solís, D., 2011. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends in Biochemical Sciences* 36, 298-313.
9. Khatun, S., Khan, M.M.H., Ashraduzzaman, M., Pervin, F., Bari, L., Absar, N., 2009. Antibacterial activity and cytotoxicity of three lectins purified from drumstick (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J. bio-sci.* 17, 89-94.
10. Lima, N.M.F., Santos, A.F., Porfírio, Z., Goulart, M.O.F., Sant'ana, A.E.G., 2002. Toxicity of lapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. *Acta Trop* 83, 43-47.
11. Lorenzi, H., 2002. *Árvores Brasileiras Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*, 4th edition, Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, São Paulo, Brasil.
12. McLaughlin, J.L., Chang, C., Smith, D., 1991. Bench-top' bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update, in: Rahman, A.U. (Ed.),

Studies in Natural Product Chemistry, Pergamon Press, London, v. 9, pp. 383-389.

13. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, L.B., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 45, 31-34.
14. Okazaki, K., Andrade Junior, H.F., Kawano, T. 1996. Effect of  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) embryos: mortality, malformation and hatching. *Braz J Med Biol Res* 29, 1057-1067.
15. Oliveira-Filho, E.C., Geraldino, B.R., Coelho, D.R., De-Carvalho, R.R., Paumgarten, F.J.R., 2010. Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. *Chemosphere* 81, 218-227.
16. Peterson, G.L., 1983. Determination of total protein. *Methods Enzymol.* 91, 95-119.
17. Ramachandran, S., Vamsikrishna, M., Gowthami, K.V., Heera, B., Dhanaraju, M.D., 2011. Assessment of Cytotoxic Activity of *Agave cantula* Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Bioassay. *Asian Journal of Scientific Research* 4(1), 90-94.

18. Santos, A.F., Cavada, B.S., Rocha, B.A.M., Nascimento, K.S., Sant'Ana, A.E.G., 2010. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. *Bioresource Technology* 101, 794-798.
19. Santos, E.A., Carvalho, C.M., Costa, A.L.S., Conceição, A.S., Moura, F.B.P., Santana, A.E.G., 2012. Bioactivity Evaluation of Plant Extracts Used in Indigenous Medicine against the Snail, *Biomphalaria glabrata*, and the Larvae of *Aedes aegypti*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, Article ID 846583, doi:10.1155/2012/846583.
20. Sharon, N., Lis, H., 2001. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2*. Kuwer Academic Plenum Publishers, Taiwan, pp. 1-19.
21. Silva Filho, C.R.M., Souza, A.G., Conceição, M.M., Silva, T.G., Silva, T.M.S., Ribeiro, A.P.L., 2009. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19(4), 919-923.
22. The International Plant Names Index, 2009, <http://www.ipni.org/>.
23. Van Damme, E.J.M., Lannoo, N., Peumans, W.J., 2008. Plant lectins. *Adv. Bot. Res.* 48, 107-209.

24. Vasconcelos, C.F.B., Maranhão, H.M.L., Batista, T.M., Carneiro, E.M., Ferreira, F., Costa, J., Soares, L.A.L., Sá, M.D.C., Souza, T.P., Wanderley, A.G., 2011. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 1533-1541.
  
25. Vaz, A.F.M.; Costa, R.M.P.B., Melo, A.M.M.A., Oliva, M.L.V., Santana, L.A., Silva-Lucca, R., Coelho, L.C.B.B.; Correia, M.T.S., 2010. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. *Food Chemistry* 119, 1507-1513.
  
26. WHO, World Health Organization, 1965. Molluscicide screening and evaluation. *Bull World Health Organ.* 33(4), 567-581.

## 7 CONCLUSÕES

Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho permitem concluir que:

- EECf apresenta baixa toxicidade oral e possui atividades anti-inflamatória e antinociceptiva significativas;
- CE e F80 possuem baixa toxicidade oral, não possuem atividades citotóxica e antitumoral frente às linhagens NCI-H292 e HEp-2 e o tumor Sarcoma-180, e reduzem a migração leucocitária e o conteúdo de nitrito no exsudato inflamatório, apresentando atividades anti-inflamatória e antinociceptiva significativas;
- CE reduz drasticamente o conteúdo de nitrito, indicando possível atividade antioxidante;
- CfeLL e CfeBL apresentam alta atividade artemicida, e CfeLL possui uma significativa atividade moluscicida.

## 8 ANEXOS

- Resumo apresentado na XLI Reunião Anual da SBBq, ocorrida de 19 a 22 de maio de 2012, em Foz do Iguaçu/PR
- Resumo apresentado na XI Reunião Regional Nordeste da SBBq, realizada no período de 5 a 7 de dezembro de 2012, em Recife/PE
- Guia de autores do periódico Bioresource Technology





### ***Caesalpinia ferrea* Aqueous Extracts and Lectins: Antioxidant Activity**

Ramos, M. C.<sup>1</sup>; Freitas, A. C. C.<sup>1</sup>; Paula, R. A.<sup>1</sup>; Cunha, C. R. A.<sup>1</sup>; Coelho, L. C. B. B.<sup>1</sup>; Carneiro-da Cunha, M. G.<sup>1</sup>; Silva, M. V.<sup>1</sup>; Correia, M.T.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

Free radicals have different roles in the body and are engaged in the production of energy, phagocytosis, regulation of cell growth and intercellular signaling. However, their excess presents deleterious effects, such as damage to DNA, proteins and lipids causing oxidative stress, which is implicated in various diseases. *Caesalpinia (Libidibia) ferrea* is a species that comes from Brazil and its different tissues are used in folk medicine presenting various therapeutic properties as antidiabetic, scarring, expectorant, antifungal, antibacterial, anti-inflammatory and anthelmintic activities. Studies with bark aqueous extracts from *C. ferrea* demonstrated the presence of proanthocyanidins, tannins hydrolysable, cinamics derivatives, and flavonoid trace amounts that make this plant a promising source of antioxidant compounds. The study aimed to purify lectins and to explore the antioxidant activity of *C. ferrea* extracts and lectins. Aqueous extracts and CfePL, CfeBL and CfeLL, respectively obtained from *C. ferrea* pod, bark and leaf, were subjected to the antioxidant activity test determined by radical 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazil (DPPH). Bark, pods and leaf extracts presented 73.1%; 71.06% and 24.7% inhibition of oxidation of the DPPH substrate, respectively; only CfeBL and CfeLL showed 30% and 9.1% of inhibition, respectively. According to these results, the antioxidant potential presented by the studied samples may be related to the therapeutic properties of *C. ferrea*.

Word Keys: Antioxidant activity; *Caesalpinia ferrea*; Lectins.  
Supported by: FACEPE, CNPq and CAPES

### ***Caesalpinia ferrea* lectins: Evaluation of Artemicidal Activity**

Ramos, M. C.<sup>1</sup>; Freitas, A. C. C.<sup>1</sup>; Paula, R. A.<sup>1</sup>; Melo, M.S.<sup>1</sup>; Neves, F.P.A; Cunha, C. R. A.<sup>1</sup>; Lima, A. L. R.<sup>1</sup>; Pereira, D. S.T.<sup>1</sup>; Coelho, L. C. B. B.<sup>1</sup>; Correia, M.T.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

Lectins are proteins that share the ability to specifically recognize and bind certain carbohydrate structures. *Artemia salina*'s high sensitivity to a broad range of compounds has promoted its use as a test organism for bioassays. Among its applications, *A. salina* has been used in the analysis of pesticide residues, stream pollutants, dinoflagellate and plant toxins, toxicity of oil dispersants and carcinogenic phorbol esters. *Caesalpinia (Libidibia) ferrea*, popularly known as "pau-ferro", is a large tree found in the North and Northeast of Brazil. In folk medicine, *C. ferrea* is used because of its various therapeutic properties as anti-inflammatory, antiulcer, analgesic, anticancer, antihypertensive, anthelmintic, antibacterial and antifungal activities. This study aimed to investigate the toxicity of three *C. ferrea* lectins, CfePL, CfeBL and CfeLL, respectively obtained from its pods, bark and leaves. Larvae of *A. salina* were exposed to different concentrations of each lectin (12.5 ppm, 25 ppm, 50 ppm and 100 ppm), during 24 h. After this period, the number of dead and survivors larvae was determined. All lectins tested promoted the death of *A. salina*. LC<sub>50</sub> of CfeLL, CfeBL and CfePL were 10.728 ppm, 25.78 ppm and 54.18 ppm, respectively. According to these results, these lectins are potential antitumor agents, since there is a good correlation between the artemicidal activity and cytotoxicity to human solid tumors. Hence, these compounds have potential biotechnological applications.

Keywords: Lectins; *Caesalpinia ferrea*; artemicidal activity.  
Supported by: FACEPE, CNPq and CAPES



### TABLE OF CONTENTS

- **Description** **p.1**
- **Audience** **p.1**
- **Impact Factor** **p.1**
- **Abstracting and Indexing** **p.2**
- **Editorial Board** **p.2**
- **Guide for Authors** **p.4**



ISSN: 0960-8524

### DESCRIPTION

*Biorresource Technology* publishes original articles, review articles, case studies and short communications on the fundamentals, applications and management of biorresource technology.

The journal's aim is to advance and disseminate knowledge in all the related areas of biomass, biological waste treatment, bioenergy, biotransformations and biorresource systems analysis, and technologies associated with conversion or production.

Topics include:

- Biofuels: liquid and gaseous biofuels production, modelling and economics
- Bioprocesses and bioproducts: biocatalysis and fermentations
- Biomass and feedstocks utilization: bioconversion of agro-industrial residues
- Environmental protection: biological waste treatment
- Thermochemical conversion of biomass: combustion, pyrolysis, gasification, catalysis

For more details, authors should consult the **Subject Classifications** in the **Guide for Authors**.

The Journal does not consider articles dealing with crop cultivation, breeding and agronomy, plant extracts and enzymes, composites, marine organisms (except microorganisms and algae for bioprocesses), soil and air pollution, and performance of fuel combustion in engines.

### AUDIENCE

Bioresource Technologists, applied microbiologists, chemical and biochemical engineers, process technologists, agro-industrial waste management technologists.

### IMPACT FACTOR

2011: 4.980 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

### ABSTRACTING AND INDEXING

- AGRICOLA
- Agricultural Engineering Abstracts
- Analytical Abstracts (Royal Society of Chemistry Information Services)
- Biosis
- Biology and Environmental Sciences
- CAB Abstracts
- Cambridge Scientific Abstracts
- Chemical Abstracts
- Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
- EMBASE
- Ecological Abstracts
- Energy Information Abstracts
- Energy from Biomass and Municipal Wastes
- Engineering Index
- Environmental Periodicals Bibliography
- Forestry Abstracts
- Fuel and Energy Abstracts
- GEOBASE
- Gas Abstracts
- SCISEARCH
- Science Citation Index
- Scopus
- Selected Water Resources Abstracts

### EDITORIAL BOARD

#### Editor-in-Chief

**A. Pandey**, Biotechnology Division, National Inst. for Interdisciplinary Science & Technology, CSIR, Trivandrum 695 019, India, Fax: +91 471 2 49 17 12, Phone +91 471 2 51 52 79

#### Editor

**R.D. Joerger**, Dept. of Animal and Food Sciences, University of Delaware, 033 Townsend Hall, Newark, DE 19717-1303, USA

**C. Larroche**, Dept. of Biochemical Engineering, Université Blaise Pascal, F-63174 Aubière, France

**H.H. Ngo**, School of Civil and Environmental Engineering, FEIT, University of Technology Sydney, CB02.05.26, No.1 Broadway, Ultimo, 2007, Australia

#### Associate Editors

**R. Anderson**, Southern Plains Agricultural Research Center, College Station, TX, USA

**D.-J. Lee**, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC

**J.M. Park**, Pohang University of Science and Technology, Pohang, South Korea

#### Editorial Board

**R.D. Ashby**, U.S. Department of Agriculture (USDA), Wyndmoor, PA, USA

**A.S. Ball**, RMIT University, Bundoora, VIC, Australia

**S. Barrington**, McGill University, Québec, QC, Canada

**A. Bergel**, Laboratoire de Génie Chimique, Toulouse, France

**R.G. Berger**, Leibniz Universität Hannover, Hannover, Germany

**R. Boopathy**, Nicholls State University, Thibodaux, LA, USA

**C.A. Cardona**, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Manizales, Caldas, Colombia

**G.R. Castro**, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

**P. Champagne**, Queen's University, Kingston, ON, Canada

**J.-S. Chang**, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, ROC

**C. Dosoretz**, Technion - Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

**C.-G. Drussap**, Université Blaise Pascal, Aubière, France

**E. Favela-Torres**, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F., Mexico

**E. Gnansounou**, École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland

**P.C. Hallebeek**, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

**J.V. Jegatheesan**, Deakin University, Geelong, VIC, Australia

**S.V. Kaluyzhnyi**, Russian Corporation of Nanotechnology, Moscow, Russian Federation

**A. Kondo**, Kobe University, Kobe, Japan

M.R. Ladisch, Purdue University, West Lafayette, IN, USA  
 J.-S. Lee, Korea Institute of Energy Research, Daejeon, South Korea  
 B.E. Logan, Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang, Malaysia  
 D. Madamwar, Sardar Patel University, Vallabh Vidyanagar, India  
 J.C. Parajó, Universidad de Vigo, Lugo, Ourense, Spain  
 J. Pruvost, Université de Nantes, Saint-Nazaire Cedex, France  
 K.B. Ramachandran, Indian Institute of Technology Madras, Chennai, India  
 H.W. Ryu, Chonnam National University, Gwangju, South Korea  
 S. Saka, Kyoto University, Kyoto, Japan  
 A. Sanchez, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain  
 M.A. Sanroman, Universidad de Vigo, Vigo, Spain  
 E. Santacesaria, Università di Napoli "Federico II", Napoli, Italy  
 T. Satyanarayana, Technische Universität Bergakademie Freiberg, Freiberg, Germany  
 M.W. Schlotmann, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil  
 C.R. Soccol, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil  
 L. Szpyrkowicz, Università Ca' Foscari Venezia, Venezia, Italy  
 M. Taherzadeh, University of Borås, Borås, Sweden  
 R.D. Tyagi, INRS, Québec, QC, Canada  
 C. Visvanathan, Asian Institute of Technology, Klongluang, Pathumthani, Thailand  
 P. Weimer, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), West Madison, WI, USA  
 J.W.C. Wong, Hong Kong Baptist University, China  
 H.-Q. Yu, University of Science & Technology of China, Anhui, China

## GUIDE FOR AUTHORS

### INTRODUCTION

*Biorescience* Technology publishes original articles, review articles, case studies and short communications on the fundamentals, applications and management of bioresource technology.

The journal's aim is to advance and disseminate knowledge in all the related areas of biomass, biological waste treatment, bioenergy, biotransformations and bioresource systems analysis, and technologies associated with conversion or production.

Topics include:

- Biofuels: liquid and gaseous biofuels production, modeling and economics
- Bioprocesses and bioproducts: biocatalysis and fermentations
- Biomass and feedstocks utilization: bioconversion of agro-industrial residues
- Environmental protection: biological waste treatment
- Thermochemical conversion of biomass: combustion, pyrolysis, gasification, catalysis

For more details, authors should consult the **Subject Classifications** in the Guide for Authors.

The journal does not consider articles dealing with crop cultivation, breeding and agronomy, plant extracts and enzymes, composites, marine organisms (except microorganisms and algae for bioprocesses), soil and air pollution, and performance of fuel combustion in engines.

*Types of paper*

When submitting a manuscript to the journal, authors must choose one or more classifications that best describe their manuscript. A list of classifications can be found [here](#)

*Submission of papers:*

Papers from all over the World: Please use Elsevier's online submission system to submit to the journal. The direct link is <http://ees.elsevier.com/bite/>

*Covering letter to the editor:*

When submitting the manuscript, it is mandatory to include a covering letter to the editor: The covering letter must state:

- (1) Subject Classification selected from the list (see guide for authors and select the most suitable ONE ONLY).
- (2) That all the authors mutually agree that it should be submitted to BITE.
- (3) It is the original work of the authors.
- (4) That the manuscript was not previously submitted to BITE.
- (5) State the novelty in results/findings, or significance of results.

*Types of contributions:* Original research papers, review articles, case studies, short communications, book reviews. Review articles would be generally solicited by the editors from the experts. However, these can be contributed by others also. In this case, authors must consult the editor by sending the extended summary (300–400 words), outline and the list of publications of authors on the topic.

### BEFORE YOU BEGIN

#### **Ethics in publishing**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

#### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.



### Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. In order of originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts.

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have

entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

**Language and language services**  
Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). The Editors suggest avoidance of usage of first person (we, us, our) in the text. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

Please note that poor language may cause the rejection of the manuscript.

### Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

### Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/biata>.

### Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 5 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

The Executive Editor first evaluates all manuscripts on technical aspects such as compliance to the Guide For Authors, quality of grammar or English language. Revision can be requested. Manuscripts accepted at this stage are passed to the handling editor who can also reject on the basis of insufficient originality, serious scientific flaws, or because the work is considered outside the aims and scope of the journal. Those that meet the minimum criteria are passed on to experts for review. Referees advise the editor, who is responsible for the final decision to accept or reject the article. **Please note:** Any Editor's decision is final.

Manuscripts previously rejected by the Journal will not be re-considered by the Editors, and therefore will be rejected without review.

### PREPARATION

#### Manuscript Preparation

#### General:

Authors must follow guide for authors strictly, failing which the manuscripts would be rejected without review. Editors reserve the right to adjust the style to certain standards of Uniformity.

#### Structure:

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Figure Captions, Tables and Figures. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

#### Text Layout:

Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the Journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 pt font size and standard fonts.

**Page length:** Maximum page length should be 15, 35 and 40 pages for Short Communication, Original article/case study and review paper, including text, references, tables and figures. Each figure and table must be put separately on a single page.

#### **Use of wordprocessing software**

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidelines>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

#### **LaTeX**

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/eps/ftnd/authorview/authorstyles/latex-ees-supported>.

The Elsevier 'elsarticle' LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quicks guide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: `elsarticle.cls`, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

#### **Article structure**

**Subdivision - numbered sections**

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### **Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### **Material and methods**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### **Experimental**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### **Theory/calculation**

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### **Results and Discussion**

Results should be clear and concise, and be part of a single section, discussing the significance of the results of the work, not repeat them. Extensive citation and discussion of the published literature should be avoided.

#### **Conclusions**

The main conclusions drawn from results should be presented in a short Conclusions section (**maximum 100 words**).

#### **Appendices**

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

#### **Essential title page information**

**Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

**Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names, indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

**Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

**Present/permanent address.** If an author has moved since the work, described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. Each paper should be provided with an abstract of about 100-150 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

#### **Graphical abstract**

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work, described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 331 x 1328 pixels (h x w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 x 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](http://www.elsevier.com/locate/illustration-service).

#### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

#### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords to be included in an article, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.



### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proofreading the article, etc.).

### Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g.,  $X/Y$ . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of  $e$  are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### Artwork

#### Electronic artwork

##### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the image to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

- EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
- TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
- TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
- TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

#### Picase do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding**

**the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**Please note:** Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. Multiple figures can be expressed as one figure (for e.g. 1a, 1b, 1c etc...), while retaining the maximum limit of 6. The Journal discourages publication of simple one line graphs/figures, pattern figures, conventional spectra (X-ray, FTIR, UV, NMR, etc) and SEM photographs of a routine nature.

#### Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. The Journal discourages publication of simple one parameter tables; such information should be preferably described in the text itself.

#### References

Maximum 20, 35 and 75 references for short communication, original research paper/case study and review papers, respectively.

#### Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
  2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
  3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically).

**References in the list should be placed first alphabetically, then numbered chronologically.**

Examples: 'as demonstrated (Allen, 2000a, 2000b, 1999, Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically, THEN NUMBERED NUMERICALLY, and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Haeerds, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mellett, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones, B.S.,

Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Index names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/bsd/serials/ji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.isn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sect.html>.

#### Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

**Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
  - Full postal address
  - Telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
  - All figure captions
  - All tables (including title, description, footnotes)
- Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'

- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

• If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

#### AFTER ACCEPTANCE

##### Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in Press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the *Journal Physics Letters B*):

<https://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

##### Publication of Articles

After acceptance the Journal will publish articles quickly both online and in print. Requests for delayed publication of the accepted articles are generally not acceptable.

##### Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

##### Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermark-ed version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

##### AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>