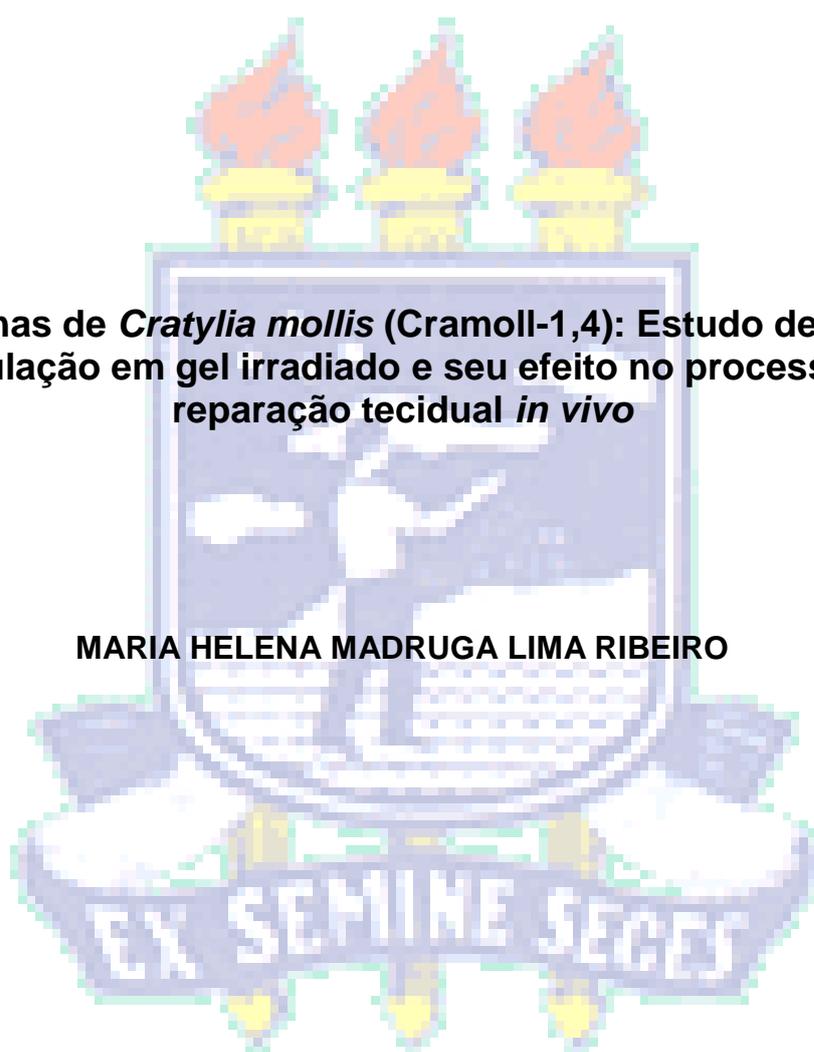




UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL



**Lectinas de *Cratylia mollis* (Cramoll-1,4): Estudo de uma
formulação em gel irradiado e seu efeito no processo de
reparação tecidual *in vivo***

MARIA HELENA MADRUGA LIMA RIBEIRO

RECIFE/2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

MARIA HELENA MADRUGA LIMA RIBEIRO

Título:

Lectinas de *Cratylia mollis* (Cramoll-1,4): Estudo de uma formulação em gel irradiado e seu efeito no processo de reparação tecidual *in vivo*

Defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco para obtenção do Título de Doutor em Biociência Animal, Área de Concentração Biotecnologia de Produtos Bioativos.

Orientador:

Profa. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão

Co-Orientadores:

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Ficha catalográfica

L732L Lima-Ribeiro, Maria Helena Madruga
Lectinas de *Cratylia mollis* (Cramoll – 1,4): estudo de uma
formulação em gel irradiado e seu efeito no processo de
reparação tecidual *in vivo* / Maria Helena Madruga Lima-
Ribeiro. – Recife, 2011.
140 f. : il.

Orientadora: Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão.

Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia
e Fisiologia Animal, Recife, 2011.

Inclui referência e anexo.

1. Lectinas 2. *Cratylia mollis* 3. Irradiação 4. Reparação
tecidual I. Carneiro-Leão, Ana Maria dos Anjos, orientadora
II. Título

CDD 615

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Lectinas de *Cratylia mollis* (Cramoll-1,4): Estudo de uma formulação em gel irradiado e seu efeito no processo de reparação tecidual *in vivo*

MARIA HELENA MADRUGA LIMA RIBEIRO

Defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco para obtenção do Título de Doutor em Biociência Animal, Área de Concentração Biotecnologia de Produtos Bioativos. Banca Examinadora:

Ana maria chãõ

Profa. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão
(PPGBA, DFMA/UFRPE – presidente)

R. M. Nogueira

Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira
(PPGBA, DFMA/UFRPE)

Valéria W. Teixeira

Profa. Dra. Valéria Wanderley Teixeira
(PPGBA, DFMA/UFRPE)

Célia M. Barbosa de Castro

Profa. Dra. Célia Maria Barbosa de Castro
(Dep. Medicina Tropical/UFPE)

Mário R. de Melo Junior

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Junior
(Dep. Patologia/UFPE)

12/12/2011

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, pela vida e pelos valores morais que sempre me ensinaram. Pelos sacrifícios que fizeram para me proporcionar um ensino de qualidade, por participarem ativamente de todas as "empreitadas" idealizadas, dos cursos à noite, finais de semana... Em fim, por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem incondicionalmente, **MUITO OBRIGADO, EU AMO VOCÊS!**

Ao meu grande amor Ramon, meu marido, companheiro, pela compreensão, apoio e cumplicidade, pelo respeito aos meus ideais, que ao final eram sempre "NOSSOS IDEAIS" de crescer sempre juntos. Essa nova conquista é nossa, pois com você sei que posso contar hoje e sempre, você é realmente especial.

Ao meu filho Ronny, meu filho único, amor da minha vida, **UM PRESENTE DE DEUS...** Filho maravilhoso, que mostra uma personalidade forte, responsável e muito estudioso, motivo de muito orgulho, mas que como toda criança com idéias mirabolantes...

DEDICO A VOCÊS MAIS ESTA CONQUISTA.

AGRADECIMENTOS DE CORAÇÃO

A Deus, pela vida, pela força e coragem de seguir em frente, mesmo diante das adversidades e injustiças, que infelizmente surgiram, mas que foram superadas e esquecidas.

Pela grandiosidade da Tua Presença, pois neste período tive a infelicidade de vivenciar momentos de doença e perdas na família que foram difíceis de entender e aceitar, mas que serviram de exemplo para que não se perca tempo pensando em coisas pequenas, mas apenas em viver cada momento intensamente e com gratidão, pois este pode ser o último e nunca se deixar abater por pequenas derrotas, pois a grande vitória é estar vivo, com saúde e junto daqueles que amamos e que fazem da nossa vida uma eterna alegria, **MUITO OBRIGADO SENHOR!**

Aos meus irmãos, cunhadas, sobrinhos e afilhados queridos por fazerem parte da minha vida e pelo apoio e incentivo constantes e pelo enorme carinho que nos mantém unidos sempre, em qualquer situação.

À minha cunhada e afilhada linda, aos meus sogros, por me apoiarem sempre, principalmente por cuidarem do meu filho nos momentos em que mais precisei.

MINHA ETERNA GRATIDÃO.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Professora Doutora, Orientadora e Amiga Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, obrigado por confiar em mim, neste nosso trabalho e por sempre falar aos "quatro cantos" e a quem interessar ou não do meu trabalho como profissional, por me fazer capaz de acreditar que é possível fazer a diferença...

Ao Professor Doutor Nicodemos Teles de Pontes Filho, pelo seu apoio profissional e pela sua amizade e carinho, sempre transmitindo uma segurança e serenidade, fundamentais no decorrer deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Tereza Correia, por seu apoio fundamental na elaboração e desenvolvimento deste estudo e pelos conhecimentos transmitidos.

À Professora Doutora Célia Maria Barbosa de Castro, pela sua tranquilidade e simplicidade em transmitir conhecimento, um exemplo de profissional dedicada e digna de admiração e respeito.

Ao Doutor Radiofarmacêutico Ralph Oliveira por sua colaboração fundamental na execução deste trabalho, pela sua amizade, companheirismo e dinamismo, tornando tudo simples e rápido de ser resolvido, sem estresse!

Ao Professor Doutor Romildo Nogueira, exemplo de profissional ético, justo e acima de tudo um educador.

À minha grande amiga e colaboradora Adriana, por todo apoio moral e profissional em todos os momentos de mais este trabalho e por ser uma companheira muito querida que fica se gabando por ser "muito

organizada" e que sempre acha tudo o que perco na minha eterna "bagunça".

Ao Professor Doutor Antônio Roberto do Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco, pelo incentivo profissional e por tornar possível a realização dos capítulos *in vivo* desta pesquisa num ambiente cirúrgico adequado e com uma equipe de profissionais extremamente dedicada e eficiente.

À equipe de técnicos e auxiliares do Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE, Dona Dora, Dona Lourdes, Senhor Paulo, Senhor Barraca e Lindinha, que fazem com que os trabalhos sigam uma cronometria eficiente, desde o preparo do material, da sala de cirurgia, do cuidado e respeito pelos animais, mostrando um verdadeiro trabalho em equipe, com sintonia, eficiência e responsabilidade.

Ao Professor Doutor Juliano Sálvio I. Cazuzu, Chefe da Unidade de Laboratório do Hospital das Clínicas pela autorização para realização dos exames laboratoriais das amostras empregadas neste estudo, sem os quais seria impossível a obtenção de dados bioquímicos séricos.

À Professora Doutora Eleonora M. Pereira de Luna Freire, Chefe do Laboratório de Análises Mineraias, Solos e Água, através da Técnica Lilian Maria Cesar de Araújo, pela realização dos exames laboratoriais das

dosagens mineraias ósseas empregadas neste trabalho.

Aos meus companheiros e amigos da 1ª TURMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL, para ficar na história... Pela cumplicidade, apoio, compreensão e capacidade de mesmo já tão cheios de compromissos conseguirem um tempinho para ajudar, para

simplesmente conversar, rir e compartilhar todos os momentos, vocês são realmente especiais...

Ao meu amigo e companheiro Edeones Tenório, Médico Veterinário do Departamento de Nutrição da UFPE, pelo fornecimento dos animais.

Ao Professor Doutor José Luiz de Lima Filho, Diretor do LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami), Órgão Suplementar da Universidade Federal de Pernambuco pelo incentivo ao crescimento pessoal e profissional, não só a mim, mas a todos os Técnicos Administrativos que fazem parte deste Laboratório.

À Professora Doutora Elizabeth Cavalcanti Chaves, pelo apoio e conhecimentos profissionais e de vida.

À Professora Doutora Maria do Carmo Pimentel, Coordenadora Administrativa do LIKA, pelo seu espírito empreendedor que mostra uma personalidade forte e dinâmica, um exemplo de profissional e educador.

À Fátima Diniz, amiga e irmã de coração, pelo seu carinho, pelas suas brincadeiras "sem noção", mas que tornam o nosso "dia a dia" uma eterna alegria e como profissional extremamente eficiente e comprometida.

Ao Sr. Otaviano um grande exemplo de profissional dedicado, que mesmo após a sua aposentadoria continua nos brindando com o seu trabalho indispensável ao bom funcionamento dos equipamentos do LIKA e por que não dizer das pessoas que têm o privilégio de poder conhecer a pessoa fantástica que ele é.

Ao meu amigo e companheiro de trabalho Luiz Felipe Wanderley Viegas, que torna possível manter o Biotério do LIKA num patamar de qualidade de extrema importância aos trabalhos científicos

desenvolvidos no setor e por estar sempre presente e disposto a ajudar em todas as vezes que precisei.

A Paulo, pelo seu trabalho de extrema importância no Biotério do LIKA e que consegue pela sua espontaneidade e simplicidade tornar um ambiente de trabalho eficiente, tranquilo e na maioria das vezes divertido.

A Vera e Edson, prontos a ajudar no possível, com ouvidos atentos para ouvir meus lamentos, frustrações e receios, mas sempre com uma palavra de incentivo e brincadeiras que vinham no momento certo.

À Carmelita pela amizade e pelo profissionalismo, de indiscutível importância nos resultados histológicos deste trabalho e de muitos outros.

A Rafael Padilha pela sua amizade e orientação profissional, no preparo das amostras que seriam submetidas à Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos meus amigos e companheiros "federais" do LIKA por sermos uma EQUIPE, pela UNIÃO E CUMPLICIDADE que fazem parte da minha vida, como uma SEGUNDA FAMÍLIA que tenho a honra de compartilhar conquistas, algumas tristezas, mas com certeza muito mais alegrias.

À Mauricélia Firmino, Pós-Graduanda que desde o início se propôs a me ajudar na fase de Determinação da Atividade Hemaglutinante da Lectina, mesmo estando na correria dos seus próprios trabalhos.

Maria, Técnica do Laboratório de Bioquímica de Proteínas da UFPE, que sempre, com toda a sua tranquilidade e segurança esteve presente em todos os momentos em que dela precisei.

Aos Técnicos do Departamento de Energia Nuclear da UFPE, que com sua pontualidade e eficiência tornou a fase de esterilização da matéria prima empregada neste trabalho um exemplo de profissionalidade.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS.

AOS ANIMAIS

Pequenos companheiros da minha vida que foram fundamentais em meus estudos, pesquisas e descobertas. Principais responsáveis pela realização de mais este sonho. No início, foi enorme a minha insegurança e muitos foram os meus erros. Aprendi a ver vocês com outros olhos, diferentes daqueles com os quais estava acostumada. Assumi, então, o risco de parecer cruel aos olhos daqueles que estão de fora, consciente de que tudo sempre foi realizado com muito respeito e dedicação, procurando toda e qualquer alternativa para minimizar o sofrimento de cada um de vocês. Vocês foram meus maiores professores, ensinando através de gestos e olhares, a ter paciência e principalmente, a ter humildade, ensinando-me o que não estava escrito nos livros, o imprevisível. Obrigado por ensinarem um pouco mais da vida e por serem o maior e melhor motivo que me fez chegar aonde cheguei.

"No semblante de um animal que não fala, há todo um discurso que somente um espírito sábio pode realmente entender."

Mahatma Gandhi

“Há dois tipos de sabedoria: a inferior e a superior. A sabedoria inferior é dada pelo quanto uma pessoa sabe e a superior é dada pelo quanto ela tem consciência de que não sabe. Tenha a sabedoria superior. Seja um eterno aprendiz na escola da vida”.

Chico Xavier

Se eu pudesse...

"Se eu pudesse deixar algum presente a vocês...

Deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos.

A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora.

Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.

Deixaria a capacidade de escolher novos rumos.

Deixaria para vocês se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável:

Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação.

E, quando tudo mais faltasse, um segredo:

O de buscar no interior de si mesmo, a resposta e a força para encontrar a saída."

Mahatma Gandhi

RESUMO

Camaratu ou feijão Camaratuba é uma leguminosa da região semi-árida do Nordeste do Brasil. Lectinas de *Cratylia mollis* (Cramoll-1,4), foram estruturalmente caracterizadas e seus efeitos biológicos e farmacológicos continuam sob investigação, pois seu uso como um produto biofarmacêutico requer maior aprofundamento. O objetivo deste estudo foi propor e caracterizar uma formulação em gel irradiada de Cramoll-1,4, quanto à preservação das propriedades *in vitro* das lectinas, sob o efeito de radiação gama e sua atividade em processos de reparo tecidual *in vivo*. Inicialmente foi feita a extração e purificação da Cramoll-1,4, foi desenvolvida uma formulação em gel utilizando-se Carbopol® como veículo, que foi irradiada com raios gama de Co⁶⁰ em uma dose de 7,549 kGy h⁻¹. Para avaliação da biodistribuição, a Cramoll-1,4 foi incubada com Tc-99 e para caracterizar a marcação foi feita cromatografia em camada fina. Em seguida o gel foi empregado em protocolos de reparação tecidual *in vivo*, mais especificamente tecido ósseo e epitelial. A formulação proposta na concentração de 300 µg manteve a atividade hemaglutinante *in vitro*, sugerindo um papel de “proteção”, dificultando a inativação da Cramoll-1,4 pela radiação. A biodistribuição do referido gel foi avaliada a partir da marcação com tecnécio, mostrou que esta lectina foi captada pelo intestino, metabolizada pelo fígado e excretada pelos rins e não ultrapassa a barreira hematoencefálica. Quanto à aplicação tópica do gel irradiado da Cramoll-1,4 na concentração de 300 µg em defeitos ósseos foi observado que a formulação, promoveu um estímulo imediato no tecido conjuntivo mole, dificultando, entretanto, o contato direto entre a formulação e o tecido ósseo. Assim, observou-se a formação de tecido fibroso e não a esperada neoformação óssea. Em paralelo, a aplicação tópica regular do gel irradiado da Cramoll-1,4 na concentração de 100 µg para o tratamento de queimaduras cutâneas de segundo grau experimentalmente induzidas, acelerou os processos de granulação, reepitelização e retração da ferida.

Palavras-chave: *Cratylia mollis*; gel irradiado; atividade hemaglutinante; reparo tecidual.

ABSTRACT

Lectins *Cratylia mollis* (Cramoll-1,4) have been structurally characterized and their biological and pharmacological effects remain under investigation, since its use as a biopharmaceutical requires further elaboration. The objective of this study was to propose and characterize a gel formulation radiated Cramoll-1,4, and the preservation of properties of lectins *in vitro*, under the influence of gamma radiation and its activity in tissue repair processes *in vivo* (skin and bone). Initially, we made the extraction and purification of Cramoll-1,4, was developed a gel formulation using Carbopol® as a vehicle, which was irradiated with ⁶⁰Co gamma rays at a dose of 7,549 kGy h⁻¹. To evaluate the biodistribution, Cramoll-1,4 was incubated with Tc-99 and to characterize the marking was made thin-layer chromatography. Then the gel was used in protocols for tissue repair *in vivo*, specifically bone tissue and epithelial. The proposed formulation at a concentration of 300 µg retained the hemagglutinating activity *in vitro*, suggesting a role of "protection", making the inactivation of Cramoll-1,4 radiation. The biodistribution of this gel was evaluated from the labeling with technetium showed that this lectin was captured by the intestine, metabolized by the liver and excreted by the kidneys and does not cross the blood brain barrier. The application of the topical gel irradiated Cramoll-1,4 at a concentration of 300 µg in bone defects was observed that the formulation, promoted an immediate boost in soft tissue, making it difficult, however, direct contact between the formulation and bone tissue. Thus, we observed the formation of fibrous tissue and not the expected new bone formation. In parallel, regular topical application of gel irradiated Cramoll-1,4 at a concentration of 100 µg for the treatment of second-degree skin burns, experimentally induced, sped up the process of granulation, reepithelialization and wound contraction.

Keywords: *Cratylia mollis*; gel irradiated; hemagglutinating activity; tissue repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Área do território brasileiro ocupado pela caatinga	27
Figura 2. Estrutura terciária da lectina Cramoll-1,4	38
Figura 3. Sobrevivência microbiológica <i>versus</i> dose de irradiação	41
Figura 4. Espectro eletromagnético	42
Figura 1. CAPÍTULO 1 - Análise reológica do gel sob diferentes condições	72
Figura 2. CAPÍTULO 1 - Avaliação da atividade hemaglutinante da Cramoll-1,4 nativa e em formulação em gel sob efeito de radiação na dose de 15 kGy	73
Figura 1. CAPÍTULO 2 - Biodistribuição da Cramol em rato. (a) vista anterior; (b) vista posterior	80
Figura 1. CAPÍTULO 3 – Indução do defeito crítico	89
Figura 2. CAPÍTULO 3 – Cuidados pós-operatórios	89
Figura 3. CAPÍTULO 3 - Níveis médios séricos de albumina, fosfatase alcalina, cálcio, fósforo e magnésio segundo os diferentes períodos experimentais	92
Figura 4. CAPÍTULO 3 - Dosagem mineral óssea percentual de cálcio, fósforo e magnésio segundo os diferentes períodos experimentais	94
Figura 5. CAPÍTULO 3 - Micrografia de tecido conjuntivo ósseo de ratas, submetidas à indução de defeito crítico em osso parietal aos 15 e 30 dias de pós-operatório. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento 100×	95
Figura 6. CAPÍTULO 3 - Micrografia de tecido conjuntivo ósseo de ratas, submetidas à indução de defeito crítico em osso parietal. Coloração Tricrômico de Masson aos 15, 30, 45 e 60 dias de pós-operatório. Aumento 200×	96
Figura 1. CAPÍTULO 4 – Indução de queimaduras de segundo grau térmicas em ratos <i>Wistar</i> machos	107
Figura 2: Avaliação da atividade hemaglutinante isolectina Cramoll-1,4 pura e combinada com o hidrogel excipiente	110

Figura 3. CAPÍTULO 4 - Avaliação clínica da reparação tecidual de queimaduras de 2º grau em ratos <i>Wistar</i> do sexo masculino	112
Figura 4. Efeito da aplicação tópica de hidrogel na ferida queimada expresso em percentagem de contração da ferida	113
Figura 5. Tecido epitelial de ratos submetidos a queimaduras térmicas de segundo grau. Coloração Tricrômico de Masson. Ampliação 100x	118

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Atividade Biológica das Lectinas	36
Quadro 2. Atividade Biológica das Lectina de <i>C. mollis</i>	39
Tabela 1. CAPÍTULO 1 - Recuperação de micro-organismos inoculados em amostras de gel	71
Tabela 2. CAPÍTULO 1 - Efeito dos raios gama nas amostras contaminadas	71
Tabela 1. CAPÍTULO 2 – Cromatografia crescente de Tc ^{99m} -cramol comparação com percentual livre (Na ^{99m} TcO ₄)	80
Tabela 2. CAPÍTULO 2 - Biodistribuição das amostras marcadas em rato	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

BMPs – *Bone Morphogenetic Proteins*

BSA – *Bovine Serum Albumin*

CEEA – Comissão de Ética em Experimentação Animal

Co⁶⁰ – Cobalto sessenta

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

Con A – Concavalina A

C. mollis – *Cratylia mollis*

Cramoll-1,2,3,4 – Lectina de *Cratylia mollis*, isoformas 1, 2, 3 e 4

Cramoll-1,4 – Lectina de *Cratylia mollis*, isoformas 1 e 4

CSD – *Critical Size Defect*

FGF – *Fibroblast Growth Factor*

GMP - *Good Manufacturing Practices*

HA – *Hemagglutinating Activity*

HE - Hematoxilina-Eosina

IL – Interleucinas

kGy – Quilo Gray

PBS - Solução salina isotônica, tamponada com fosfato de sódio 15 M.

PDGF – *Platlet Derived Growth Factor*

PHA – Lectina de *Phaseolus vulgaris* L.

SHA – *Specific hemagglutinating activity*

TGF- β - *Transforming Growth Factor β*

TM - Tricrômico de Masson

USP – *United States Pharmacopeia*

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	li
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	lii
LISTA DE TABELAS E QUADROS	liv
LISTA DE ABREVIATURAS	lv
CAPÍTULO 1 – Revisão Bibliográfica	
1. INTRODUÇÃO	26
1.1. Lectinas	26
1.1.1. Conceitos	27
1.1.2. Histórico	29
1.1.3. Extração e Purificação	29
1.1.4. Classificação	32
1.1.5. Atividade Biológica	36
1.2. <i>Cratylia mollis</i>	37
1.2.1. Formas Moleculares	38
1.2.2. Atividade Biológica das Lectinas de <i>C. mollis</i>	39
1.3. Princípios da Irradiação	39
1.3.1. Esterilização	40
1.3.2. Radiação Ionizante	41
1.3.3. Radiação Gama	41
2. HIPÓTESE	45
3. OBJETIVOS	45
4. BIBLIOGRAFIA	46
CAPÍTULO 2 – Artigo 1 (Anexo 1 e 2)	
Avaliação <i>in vitro</i> da influência da radiação gama em uma formulação em gel da lectina de <i>Cratylia mollis</i>	65
RESUMO	65
ABSTRACT	66
INTRODUÇÃO	66
METODOLOGIA	68
Purificação da Lectina	68
Atividade Hemaglutinante	69
Formulação em Gel	69
Irradiação do Gel	69
Análise Reológica	70
Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i>	70
Cepas e Meios	70
Validação do Método	70
Tratamento das Amostras	70
RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
CONCLUSÃO	74
AGRADECIMENTOS	74
REFERÊNCIAS	74
CAPÍTULO 3 – Artigo 2 (Anexo 3 e 4)	
Radiomarcagem da Cramoll-1,4: Avaliação da biodistribuição	78
RESUMO	78
ABSTRACT	78
INTRODUÇÃO	79

METODOLOGIA	79
Cromatografia	79
Biodistribuição	80
RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
Cromatografia	81
Estudos de Biodistribuição	81
CONCLUSÃO	82
AGRADECIMENTOS	82
REFERÊNCIAS	82
CAPÍTULO 4 – Artigo 3 (Anexo 5)	
Avaliação da eficácia da formulação em gel da lectina de sementes de <i>Cratylia mollis</i> no processo de reparo ósseo em ratas	
	85
RESUMO	85
ABSTRACT	86
INTRODUÇÃO	86
METODOLOGIA	88
Formulação em Gel Irradiado da Cramoll-1,4	88
Seleção e Tamanho da Amostra	88
Indução do Defeito Crítico	88
Eutanásia e Coleta de Amostras	90
Bioquímica Sérica	90
Cálcio, Fósforo e Magnésio	90
Albumina e Fosfatase alcalina	90
Dosagem Mineral Óssea - Proporção de Ca, P e Mg	91
Obtenção e Processamento de Material para Análise Histológica do	
Reparo Ósseo	91
Estatística	91
RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
CONCLUSÃO	98
AGRADECIMENTOS	99
REFERÊNCIAS	99
CAPÍTULO 5 – Artigo 4 (Anexo 6)	
Efeito da aplicação tópica do hidrogel isolectin (Cramoll-1,4) em queimaduras de segundo grau: Modelo experimental	
	103
RESUMO	103
ABSTRACT	104
INTRODUÇÃO	104
METODOLOGIA	105
<i>Cratylia mollis</i> (Extração e Purificação)	105
Hidrogel	106
Avaliação da Atividade Hemaglutinante do Hidrogel Isolectina	106
Animais e Feridas Experimentais	106
Animais	106
Queimaduras	107
Observações Patológicas	107
Parâmetros Clínicos	107
Quantificação da Retração da Ferida	108
Avaliações Bioquímicas e Hematológicas	108
Histopatologia	108
Estatística	109

RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
Atividade Hemaglutinante	109
Parâmetros Clínicos	111
Quantificação da Retração da Ferida	112
Avaliações Bioquímicas e Hematológicas	114
Histopatologia	115
CONCLUSÃO	119
AGRADECIMENTOS	119
REFERÊNCIAS	119
5. CONCLUSÕES	125
6. ANEXOS	126
6.1. ANEXO – 1 – Artigo Submetido – Revista Braileira de Farmacognósia	127
6.2. ANEXO – 2 – Apresentação no 3º Congresso Brasileiro de Biotecnologia – Fortaleza – Ceará	129
6.3. ANEXO – 3 – Artigo publicado - International Journal of Peptides	131
6.4. ANEXO – 4 – Apresentação no Congresso 71 st International Congress of FIP	135
6.5. ANEXO – 5 – Artigo Submetido – Journal Bone – Elsevier - Journals	137
6.6. ANEXO – 6 – Artigo aceito para publicação – Journal of Biomedicine and Biotechnology	139

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lectinas

Os avanços tecnológicos na indústria farmacêutica e no uso de substâncias medicinais extraídas dos vegetais têm sido responsáveis por novas oportunidades terapêuticas e melhoria da qualidade de vida do ser humano e dos animais. As pesquisas buscam investigar os mecanismos biológicos e farmacológicos associados à ação das substâncias de origem vegetal, a partir da elaboração de novos fármacos que venham a favorecer ou mesmo modelar a resposta do organismo diante dos diversos processos patológicos. Entre essas, as lectinas emergem, tendo sido testadas sob diferentes formulações, frente a diversos modelos experimentais, mostrando-se eficazes como agentes terapêuticos (HOUGHTON et al., 2005).

Estendendo-se do norte do estado de Minas Gerais, centro-norte do estado da Bahia até a região entre os estados do Piauí e Ceará, localiza-se a caatinga do Brasil, rica em leguminosas arbustivas, como as dos gêneros *Cannavalia*, *Dioclea* e *Cratylia*. De acordo com Sharon e Lis (1990) lectinas foram detectadas em mais de 600 espécies e variedades de leguminosas. Entre essas se destaca a *Cratylia mollis*, também conhecida como feijão camaratu ou camaratuba (QUEIROZ e CORADIN, 1995; SOUSA e OLIVEIRA, 1995).

A caatinga (Figura 1) ocupa uma área de 734.478 km², que corresponde a cerca de 7% do território brasileiro. Representa o único bioma exclusivamente brasileiro, ou seja, grande parte do patrimônio biológico dessa região só é encontrada na caatinga brasileira e em nenhum outro lugar do mundo. A caatinga apresenta três estratos: o arbóreo, medindo de 8 a 12 metros de altura, o arbustivo com altura de 2 a 5 metros e o herbáceo com altura abaixo de 2 metros (AMBIENTEBRASIL, 2011).



Figura 1: Área do território brasileiro ocupado pela caatinga.

Disponível em: <http://exploradordosertao.blogspot.com>

Grupos de pesquisa na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e na Universidade Federal do Ceará (UFC) têm desenvolvido esforços para extrair, purificar e caracterizar essas lectinas. A perspectiva de aplicação biotecnológica é uma consequência natural da versatilidade dessas proteínas.

A escolha de um fármaco, em uma determinada dosagem, em uma formulação característica e seguindo uma posologia específica tem como objetivo sinalizar células e tecidos de alterações no meio e, conseqüentemente, estimular respostas específicas e desejadas. Desta forma, produtos oriundos de plantas ou animais continuam a ser uma importante e valiosa perspectiva no desenvolvimento de fármacos. Entretanto, é necessário ressaltar que são necessários estudos farmacológicos e toxicológicos cuidadosos para comprovar sua eficácia terapêutica e segurança (HOUGHTON et al., 2005).

1.1.1. Conceitos

São diversos os conceitos atribuídos às lectinas. De acordo com Sharon e Liz (1987) e Goldstein et al. (1980) elas são proteínas ou glicoproteínas obtidas na natureza, frequentemente encontradas na superfície celular ou em partículas intracelulares. Devido a sua estrutura quaternária, apresentam pelo menos dois sítios moleculares de ligação específicos para carboidratos e outros gliconjugados,

levando à aglutinação de células ou precipitação de polissacarídeos sem alterar suas respectivas estruturas. Por esta razão, têm a capacidade de interagir com as moléculas dos fluidos biológicos e aquelas presentes na superfície celular (CORREIA et al., 2008). Em um contexto farmacológico, as lectinas podem substituir ligantes naturais e ativar respostas celulares através de diferentes caminhos de sinalização intracelular ou endocitose de compostos formados (BEUTH et al., 1995; HONG et al., 2001).

O conceito mais aceito atribuído às lectinas e divulgado no meio científico foi proposto por Peumans e Van Damme (1995; 1998a) e Peumans et al. (2001) no qual as lectinas são definidas como (glico) proteínas de origem não imune, que possuem pelo menos um domínio não-catalítico e que se ligam de maneira reversível e específica a um monossacarídeo ou oligossacarídeo. O(s) sítio(s) de ligação a carboidratos tende(m) a se dispor na superfície da molécula protéica, e é nesse ponto que as proteínas fornecem a seletividade da ligação através de pontes de hidrogênio, interações de *Van der Waals* e hidrofóbicas (SUROLIA et al., 1996; ELGAVISH e SHAANAN, 1997).

De acordo com Lis e Sharon (1981), quanto ao número de sítios de ligação a carboidratos, a maioria das lectinas é di ou polivalentes. Ao se ligarem a carboidratos específicos, perdem sua capacidade de hemaglutinação *in vitro*; esta característica tem sido útil para caracterizar aspectos funcionais da estrutura e da atividade lectínica. Algumas lectinas não apresentam um monossacarídeo inibidor, sendo inibidas apenas por oligossacarídeos. Outras lectinas apresentam interações mais fortes com oligossacarídeos do que com monossacarídeos, enquanto outras são quase exclusivas para oligossacarídeos. Segundo essas propriedades de ligação a carboidratos, as lectinas podem ser classificadas como específicas quando apresentam interação com um monossacarídeo ou não específicas quando interagem com diferentes oligossacarídeos (SHARON e LIS, 1990).

Segundo Moreira et al. (1991) a ênfase que é conferida à origem não imune das lectinas é adotada para diferenciá-las de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. Estruturalmente, observa-se similaridade no padrão básico de organização dos anticorpos, enquanto que as lectinas diferem entre si quanto à sequência de aminoácidos, requerimentos de metais, peso molecular e estrutura tridimensional; diferem, em particular, quanto à especificidade em interagir com diferentes ligantes, como o acetilamino-carboidratos, amino-carboidratos, hexoses,

pentoses, entre outros carboidratos e finalmente quanto à capacidade de precipitar polissacarídeos, glicoproteínas e glicolípídeos contendo resíduos de açúcares específicos (SINGH et al., 1999).

1.1.2. Histórico

De acordo com Beuth et al. (1995) estudos das propriedades das lectinas foram relatados pela primeira vez em 1888 por Stillmark, que avaliando a toxicidade de *Ricinus communis* (mamona), constatou que extratos dessa planta possuíam a capacidades de aglutinar eritrócitos. Hellin em 1889, utilizando o extrato de *Abrus precatorius* (jequiriti) encontrou resultados semelhantes de hemaglutinação, denominando a proteína de abrina (SHARON e LIS, 1987).

Em 1954 o termo “lectina” (do latim *legere*, pegar, colher, selecionar) foi empregado por Boyd e Shapleigh para descrever aglutininas de grupos sanguíneos específicos. Na década de 60, Nowell relatou pela primeira vez a atividade mitogênica da lectina de *Phaseolus vulgares* – PHA. Segundo Aub et al. (1963) a lectina de germe de trigo, *Triticum vulgares* – WGA foi responsável por intensa aglutinação e transformações celulares.

Grande parte dos trabalhos pioneiros nas áreas de bioquímica, fisiologia e biologia molecular de lectinas vegetais utilizaram as lectinas extraídas de leguminosas. A primeira lectina a ser purificada e cristalizada foi a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) por Summer e Howell (1936), podendo então ser definida a sua estrutura primária e tridimensional. Em 1969, Inbar e Sachs, estudando a atividade das lectinas de *C. ensiformes*, observaram uma ação preferencial de aglutinação de células malignas. Estas pesquisas impulsionaram estudos das diversas atividades biológicas e possibilidades de aplicação farmacológica que são mantidas até a atualidade.

1.1.3. Extração e Purificação

As lectinas podem ser identificadas em todas as classes e famílias de organismos (vegetais superiores, algas, fungos, animais vertebrados e invertebrados, bactérias e vírus). Em vegetais são detectadas em centenas de espécies de plantas, como as leguminosas, principalmente nas sementes, onde

são acumuladas no período de maturação e desaparecendo após a germinação. Representam cerca de 10% das proteínas totais das sementes, entretanto o volume isolado é pequeno: variando entre 0,1-1% deste total (KONOZY et al., 2003). Podem ainda ser obtidas de diferentes tecidos vegetais tais como raízes (WU et al., 2000), cascas de árvores (SÁ et al., 2009), folhas (KONOZY et al., 2002), flores (ITO, 1986), frutos (CHEUNG et al., 2009), bulbos (MO, 1994) e rizomas (NG e YU, 2001).

O processo de purificação é relativamente fácil e a sua solubilidade em soluções fisiológicas e água favorece a aplicabilidade das lectinas em inúmeros estudos experimentais (LORIS, 2002; SHARON e LIS, 2004b; ALENCAR et al., 2005a; BHOWAL et al., 2005; PODOLSKY et al., 2006; VEGA e PEREZ, 2006; OLIVEIRA et al., 2008; TSIVILEVA et al., 2008; SPRONG et al., 2009).

O processo de purificação é baseado em características como tamanho molecular, solubilidade, carga e afinidade específica de ligação a carboidratos (CORREIA e COELHO, 1995). São inúmeras as técnicas empregadas para eliminar moléculas que não sejam de interesse (contaminantes).

Diversos parâmetros estão envolvidos no processo de extração das lectinas como a seleção da solução extratora, temperatura e tempo (OSHIKAWA et al., 2000; MOURE et al., 2001). A preparação obtida, conhecida como extrato bruto, é então avaliada quanto à concentração protéica e utilizada como material primário para o isolamento da proteína.

Métodos como a precipitação seletiva de proteínas com sais (PAIVA e COELHO, 1992) ou elevadas temperaturas (BEZERRA et al., 2001) podem ser empregados a partir do extrato bruto para fracionamento das lectinas. De acordo com Coelho e Silva (2000) o sulfato de amônio é o sal mais comumente utilizado no processo de fracionamento devido à sua alta solubilidade.

O processo de fracionamento salino se baseia no princípio de que a solubilidade da maioria das proteínas diminui com o aumento das concentrações de sais, processo este conhecido como *salting-out*. As lectinas geralmente podem ser parcialmente purificadas por este processo, uma vez que o sal tem a capacidade de retirar a camada de solvatação existente ao redor das proteínas fazendo com que as mesmas precipitem. Mesmo após longos períodos de armazenamento a precipitação com sulfato de amônio pode estabilizar a atividade hemaglutinante da proteína (KENNEDY et al., 1995; COELHO e SILVA, 2000).

Segundo Kabir (1998) o processo de diálise pode ser empregado para separar as lectinas de moléculas pequenas, utilizando para este fim uma membrana de celulose semipermeável. Neste sentido as moléculas com dimensões maiores (proteínas) ficam retidas dentro do saco de diálise e as moléculas menores e os íons atravessam os poros da membrana permanecendo na solução.

Vários métodos cromatográficos podem ser empregados na purificação de lectinas. Neste processo as técnicas mais empregadas são a cromatografia de filtração em gel (REGO et al., 2002), de troca iônica (NG e YU, 2001) e cromatografia de afinidade (COELHO e SILVA, 2000). Entretanto, em decorrência da propriedade de ligação a carboidrato a cromatografia de afinidade em colunas contendo suportes polissacarídeos (CAVADA et al., 1998; MACHUKA et al., 1999; COELHO e SILVA, 2000) ou glicoproteínas (NOMURA et al., 1998; KAWAGISHI et al., 2001) tem sido a técnica mais comumente empregada na separação de proteínas.

De acordo com a especificidade da lectina, têm sido utilizadas diferentes matrizes de afinidade disponíveis comercialmente. A técnica se baseia na ligação da lectina a grupamentos químicos específicos existentes no suporte insolúvel, um exemplo é a ligação de lectinas que reconhecem glicose à Sephadex, matriz constituída por dextrana, que é um biopolímero (dissacarídeo) produzido pela ação bacteriana sobre a sacarose, formado por unidades de glicose (BRAZIL e ENTLICHER, 1999). Esse biopolímero possui diferentes limites de exclusão para lectinas específicas para glicose/manose ou seus derivados (CORREIA e COELHO, 1995; CAVADA et al., 1998). A proteína desejada é obtida com alto grau de pureza, alterando-se as condições de pH (DATTA et al., 2001), força iônica (CHUNG et al., 2001) ou através da eluição com solução contendo um competidor (LIMA et al., 1997).

Para lectinas com especificidade para N-acetil-D-glicosamina e seus oligossacarídeos ou derivados de quitina, podendo ser usada a quitina como matriz de afinidade (FREIRE et al., 2002; WANG e NG, 2003); as lectinas específicas para galactose e seus derivados podem ser purificadas utilizando agarose (NICOLSON e BLAUSTEIN, 1972); Sepharose (ANURADHA e BHIDE, 1999), Sepharose tratada com ácido (JIMBO et al., 2000), guarana (COELHO e SILVA, 2000), bem como Sepharose conjugada com glicoproteínas (GERLACH et al., 2002).

Na cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular as moléculas podem ser separadas através do tamanho. Através da cromatografia de troca iônica as proteínas podem ser separadas em função de sua carga; em que as proteínas com carga negativa (aniônicas) ligam-se à coluna de DEAE-Celulose (grupo funcional DiEtilAminoEtilo), contendo carga positiva; as proteínas com cargas positivas (catiônicas) ligam-se à coluna de CM-Cellulose (grupo funcional CarboxiMetilo) de carga negativa.

Na caracterização estrutural das lectinas são empregados métodos eletroforéticos baseados no princípio que uma molécula eletricamente carregada terá a capacidade de se mover em um campo elétrico. Neste sentido a velocidade de migração de uma proteína está na dependência direta da intensidade elétrica do campo, da carga líquida da proteína e do coeficiente de atrito. As separações eletroforéticas são quase sempre feitas em gel, onde os sais de poliacrilamida são escolhidos por serem quimicamente inertes e por ser possível controlar o tamanho dos seus poros (STRYER, 2004). A inclusão do detergente sulfato sódico de dodecila (SDS) possibilita a desnaturação da molécula protéica, sendo então possível definir a massa molecular das subunidades (COELHO e SILVA, 2000). Através da espectrometria de massa ainda pode ser feita outra caracterização que é a determinação da sequência de aminoácidos ou estrutura primária da lectina e a subsequente determinação da homologia com outras proteínas (REGO et al., 2002).

1.1.4. Classificação

Sequências de aminoácidos foram determinadas em diversas lectinas de leguminosas, quando se constatou um elevado grau de similaridade entre elas. Estas lectinas são constituídas por duas ou quatro subunidades, com massa molecular variando entre 25 kDa e 30 kDa, cada uma dessas subunidades possui um sítio de ligação para carboidratos, este processo de ligação lectina-carboidrato depende da presença simultânea de Ca^{2+} e Mn^{2+} ou outro metal de transição, que são íons essenciais para as suas atividades biológicas (SHARON e LIS, 1990; VAN DAMME et al., 1998).

Segundo CAVADA et al. (1993) apesar da similaridade de sua estrutura primária, as lectinas diferem com relação a suas especificidades finas de interação

a carboidratos, possuindo especificidade a monossacarídeos, podendo interagir com açúcares simples ou com glicanas complexas encontradas nas glicoproteínas (DRICKAMER, 1995; WEIS e DRICKAMER, 1996). Em estudos de quimiotaxonomia, envolvendo similaridades bioquímicas e aspectos estruturais das lectinas, o elevado grau de homologia entre as sequências de aminoácidos de lectinas de leguminosas permite que as mesmas sejam utilizadas como marcadores moleculares para a classificação botânica de espécies vegetais similares (BARRE et al., 1994; AINOUS et al., 1995; MOREIRA et al., 1995).

Ramos et al. (1999) estudaram detalhadamente a reatividade de várias lectinas da subtribo Diocleinae, através da inibição da atividade hemaglutinante induzida por uma grande variedade de carboidratos simples e complexos e por glicoproteínas. Comprovando que apesar de possuírem afinidade pelos monossacarídeos D-glucose e D-manose, essas lectinas interagem com carboidratos simples, reconhecendo também estruturas glicanas complexas como aquelas encontradas em glicoproteínas. Entretanto foi constatado que apesar de exibirem a mesma afinidade pelos ligantes e de serem estruturalmente semelhantes, as lectinas dessa subtribo apresentam diferenças significativas no que se refere à especificidade fina com relação a um mesmo ligante glicídico o que resulta em uma grande variabilidade de propriedades biológicas (SANZ-APARICIO et al., 1997; RAMOS et al., 1999; CALVETE et al., 2000).

Calvete et al. (2003) consideram as lectinas poderosos instrumentos que podem ser empregados na decodificação dos glicocódigos utilizados na troca de informações entre as células. Assim, a medida em que as lectinas identificam as moléculas de superfícies celulares, desencadeiam uma série de fenômenos biológicos *in vitro* ou *in vivo*.

De acordo com Cavada et al. (2001) as diferenças observadas entre as propriedades biológicas de lectinas são decorrentes de alterações nos três principais parâmetros físico-químicos: especificidade distinta à carboidratos complexos estados de oligomerização dependente de pH (GRANGEIRO et al., 1997; CALVETE et al., 1999) e orientação relativa dos sítios de ligação à carboidratos.

Esse estado de oligomerização é também conhecido como equilíbrio dimérico-tetramérico, no qual apenas a conformação tetravalente interage com

receptores da superfície celular, ativando vias de transcrição (GRANGEIRO et al., 1997; CALVETE et al., 1999).

As isolectinas foram definidas como um grupo de proteínas intimamente relacionadas, resultantes da expressão de diferentes genes (SHARON e LIS, 1990). Esta denominação pode ser dada em função das diferentes atividades biológicas atribuídas às lectinas, como a atividade hemaglutinante e mitogênica (ARAGON et al., 1993). Pode ainda estar relacionada ao padrão de migração em gel de poliácridamida em condições não desnaturantes (WONGKHAM et al., 1995); quanto à diferente especificidade para carboidratos, pequenas alterações na estrutura da molécula protéica podem ocasionar modificações na orientação do açúcar ligado à proteína e conseqüentemente alterando a especificidade da lectina (GUZMÁN-PARTIDA et al., 2004), diferença de carga (KAWAGISHI et al., 1997) ou quando são observadas modificações pós-tradução (MANDAL et al., 1994). De acordo com Ohba et al. (2003), três isolectinas da aglutinina de germe de trigo (WGA-1, WGA-2 e WGA-3) interagiram em diferentes graus com células leucêmicas e manifestaram citoaglutinação e atividade citotóxica diferentes.

Segundo Paiva e Coelho (1992) o termo isoforma é empregado para designar múltiplas formas de lectinas presentes na mesma espécie ou variedade de origem genética indefinida. De acordo com Kaku et al. (1990) algumas espécies de plantas são constituídas por duas ou mais proteínas com atividade hemaglutinante, por exemplo, *Vicia villosa* e *Sambucus nigra*. Técnicas como focalização isoeletrica, cromatofocalização ou cromatografia de interação hidrofóbica podem ser utilizadas para a separação de isoformas. Entretanto, a elucidação das diferenças estruturais das isoformas por métodos de química de proteínas pode ser trabalhosa. Um método baseado em partículas não porosas e monolítico poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB) de fase estacionária e espectrometria de massa foi empregado com o objetivo de separar isolectinas de três espécies de plantas, *Lens culinaris*, *Triticum vulgare* e *Canavalia ensiformis* (HOCHLEITNER et al., 2003).

Quanto à organização tridimensional as lectinas podem ser divididas em quatro classes distintas de acordo com o ponto de vista de organização tridimensional, com base no número de domínios de ligação a carboidratos e outros de natureza não catalítica em: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas

(PEUMANS e VAN DAMME, 1998) e superlectinas (PEUMANS et al., 2001), caracterizando-as como a seguir:

1. As merolectinas são proteínas com baixo peso molecular, possuindo apenas um sítio de ligação a carboidratos, o que significa que apresentam um único domínio lectínico; por esta característica monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar células. Um exemplo é a heveína, derivada do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), trata-se de uma proteína ligante à quitina (VAN PARRIJS et al., 1991).
2. As lectinas classificadas como hololectinas possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, que podem ser idênticos ou homólogos. A grande parte das lectinas vegetais estudadas pertence a esse grupo, que por sua capacidade de aglutinar células e glicoconjugados, são denominadas “hemaglutininas”. Um exemplo destas hololectinas são as proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIPs-2-abrina e ricina), que possuem atividade de N-glicosidase e dois sítios de ligação a carboidratos.
3. Caracterizam-se as quimerolectinas como proteínas que possuem um ou mais domínios ligantes a carboidratos e outro sítio de ligação com atividade catalítica ou outra atividade biológica, com ação independente da ligação a carboidratos. Quanto ao número de domínios lectínicos, podem ainda comportar-se como hololectinas ou merolectinas. Como exemplos de quimerolectinas temos as proteínas que inativam ribossomos tipo 2, um outro exemplo são as quitinases de plantas que podem representar quimerolectinas que se comportam como merolectinas. Isto ocorre porque as quitinases possuem, além do sítio catalítico, um único domínio de ligação a carboidratos, caracterizando a incapacidade de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados.
4. As superlectinas que representam um tipo especial de quimerolectinas, apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidrato com especificidades distintas, ou seja, apresentam dois domínios de carboidratos ligantes

estrutural e funcionalmente diferentes com capacidade de ligação a açúcares de estruturas diversas.

No que diz respeito ao pH o equilíbrio dimérico-tetramérico é responsável por modular a capacidade das lectinas de se ligar e agregar de forma específica à determinadas glicoproteínas e glicolípídeos na superfície celular, deflagrando respostas celulares distintas. Mesmo pequenas diferenças na estrutura primária têm a capacidade de alterar este equilíbrio, resultando em diferentes consequências biológicas (CALVETE et al., 1999).

A *Canavalia ensiformes* (ConA) possui estrutura tetramérica que, dependendo do pH se dissocia em dímeros (CARVALHO, 1990). De acordo com Calvete et al. (1999), outras lectinas também apresentam estrutura quaternária dependente da variação do pH.

Para efeito de identificação, as lectinas possuem quatro formas moleculares, cada uma dessas isoformas é identificada pelo termo Cramoll seguidos por numerais arábicos entre 1 e 4. Assim, referências à Cramoll-1,4 significam uma preparação que contem lectinas ligadoras específicas de glicose/manose. A Cramoll-3, entretanto, é uma glicoproteína galactose específica (PAIVA e COELHO, 1992; CORREIA e COELHO, 1995).

1.1.5. Atividade Biológica

Atividade Biológica	Lectina	Referência
Desenvolvimento e modulação de comunicação, diferenciação e proliferação celular.	Lectinas de <i>Vatairea macrocarpa</i> . Entre outras lectinas pesquisadas.	MOREIRA et al., 1991; CAVADA et al., 1998; GABIUS e GABIUS, 2002.
Desencadear alterações em processos patológicos e fisiológicos.	Lectinas de <i>Canavalia brasiliensis</i> mart. Entre outras lectinas avaliadas.	SHARON e LIS, 1990; MO et al., 2000; ISIDRO et al., 2001; SHARON e LIS, 2001.
Na detecção e isolamento de carboidratos em solução ou em superfície celular e alterações na diferenciação celular.	Extraída de sementes de <i>Artocarpus heterophyllus</i> . Entre outras lectinas.	BEUTH et al., 1995; KABIR, 1998.
Ação inseticida.	Entre outras lectinas. Lectinas extraídas de folhas de <i>Bauhinia monandra</i> de <i>Annona coriacea</i> . Lectinas de <i>Castanea crenata</i> e <i>Arisaema helleborifolium</i> .	VERCESI et al., 1988; SENGUPTA et al., 1997; NOMURA et al., 1998; COELHO e SILVA, 2000; RATANAPO et al., 2001.
Ferramenta diagnóstica na identificação de bactérias patogênicas e como marcadores de células cancerígenas e terapia do câncer.	Extraídas de <i>Morus alba</i> , de <i>Helix pomatia</i> , de <i>Agaricus bisporus</i> e de <i>Bactrocera cucurbitae</i> . Entre outras lectinas em estudadas.	RATANAPO et al., 1998, 2001; KAUR et al., 2006.

Indução de apoptose.	Entre outras lectinas, lectinas extraída de <i>Synadenium carinatum</i> . Lectinas de <i>Anagasta kuehniella</i> e <i>Corcyra cephalonica</i> .	VERCESI et al., 1988; BARBOSA et al., 2001; COELHO et al., 2007.
Resistência aos efeitos citotóxicos de proteínas.	Lectinas de <i>Annona coriacea</i> .	GASTMAN et al., 2004.
Caracterização de diferentes estágios de desenvolvimento de parasitas e efeito protetor.	Lectinas da tribo Diocleae e lectinas de <i>Synadenium carinatum</i> .	KENNEDY et al., 1995; BARRAL-NETTO et al., 1996; BOURGUIGNON et al., 1998; AFONSO-CARDOSO et al., 2007.
Modelos de estudos atômicos de interações proteína-carboidrato.	Lectinas de <i>Urnica dioica</i> , lectinas da tribo Diocleae.	RINI, 1995.
Modulação da resposta imune.	Lectinas da tribo Diocleae, entre outras lectinas estudadas.	SHIBUYA et al., 1986; BARRAL-NETTO et al., 1992; RODRIGUEZ et al., 1992; KIPATRICK, 1999; SINGH et al., 2004.
Tipagem, identificação e estudos estruturais de grupos sanguíneos.	Lectinas em geral.	SHARON e LIS, 2004a.
Ação pró-inflamatória, anti-inflamatória, analgésica, antidepressiva.	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> , lectinas de <i>Vatairea macrocarpa</i> , lectinas da subtribo Diocleinae, lectina de <i>Bryothamnion seaforthii</i> . Lectinas de <i>Arum maculatum</i> e <i>Pisum arvense</i> e de <i>Canavalia brasiliensis</i> .	RODRIGUEZ et al., 1992; ALENCAR et al., 1999; 2004; CAVADA et al., 2001; VIEIRA et al., 2004; ALENCAR et al., 2005b,c; BARAUNA et al., 2006.
Indução da produção de histamina e Óxido nítrico <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	Diversas lectinas, entre elas a Concanavalina A.	GOMES et al., 1994; FERREIRA et al., 1996; ANDRADE et al., 1999.
Atividade hipoglicemiante.	Lectinas de <i>Urtica pilulifera</i> .	KAVALI et al., 2002.
Biodisponibilidade dos princípios ativos, maior eficiência terapêutica e menores efeitos colaterais.	Lectinas de <i>Castanea crenata</i> , entre outras lectinas estudadas.	LAWRENCE, 1994; BERTHELOT et al., 1998; NOMURA et al., 1998; PONCHEL e IRACHE, 1998; RATANAPO et al., 2001.
Reparação de lesões cutâneas.	Lectinas de <i>Canavalia brasiliensis</i> , <i>Dioclea violacea</i> , <i>Parkia pendula</i> , extrato de <i>Stryphnodendron polyphyllum</i> Mart. e <i>Stryphnodendron bovatum</i> Benth.	CHOI e CHUNG, 2003; SCHIRATO et al., 2004; LOPES et al., 2005; PORTO et al., 2006; SCHIRATO et al., 2006.

Quadro 1. Atividade Biológica das Lectinas.

1.2. *Cratylia mollis*

A *C. mollis*, pertence à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae que compreende 13 gêneros, dos quais desatacam-se os gêneros: *Canavalia*, *Cratylia*, *Calopogonium*, *Dioclea*, *Galactia* e *Herpyza*, já devidamente detectadas e isoladas e empregadas em diversos estudos quer seja quanto às suas propriedades bioquímicas ou efeitos biológicos *in vitro* e

in vivo (POLHILL et al., 1981). O doutor Marcelo Ataíde foi responsável pela classificação botânica da forrageira, catalogada sob o número 51.130, na coleção do Departamento de Botânica Sistemática da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), Recife – PE.

1.2.1. Formas Moleculares

As sementes de *C. Mollis* foram avaliadas quanto à presença de lectinas (Cramoll) obtendo-se quatro isolectinas a partir de diferentes frações (F) de precipitados salinos (F0-40%, F40-60% e F60-80%). Cramoll 1, a isolectina mais abundante nas sementes desta planta, foi purificada através de F40-60%; desta fração obteve-se também por cromatografia de afinidade uma preparação purificada contendo as isoformas 1 e 4 associadas, denominada Cramoll Sephadex ou Cramoll-1,4 (PAIVA e COELHO, 1992; CORREIA e COELHO, 1995) (Figura 2), mistura de Cramoll 1 e sua isoforma, Cramoll 4, as quais podem ser separadas por cromatografia de troca iônica (CORREIA e COELHO, 1995). Cramoll 2 e Cramoll 3 foram isoladas por Paiva e Coelho (1992). A classificação das isolectinas foi feita de acordo com a migração eletroforética em gel para proteínas básicas nativas; Cramoll 1, proteína mais básica, apresenta a maior migração, seguida de Cramoll 2; Cramoll 3 é a menos básica das três (PAIVA e COELHO, 1992; CORREIA e COELHO, 1995).

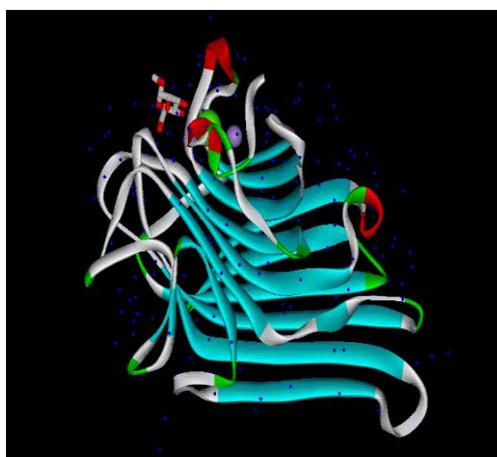


Figura 2: Estrutura terciária da lectina Cramoll-1,4 (Souza et al., 2003).

Tavares et al. (1996) cristalizaram a Cramoll, descrevendo suas propriedades físico-químicas e potencial eletroquímico (BASZKIN et al., 2000; SOUZA et al., 2001).

A Cramoll-1,4 apresenta certa estabilidade até 80° C, com ponto isoelétrico em torno de 8,6 e caráter básico. Possui uma banda principal de 31 kDa e dois fragmentos da banda principal de 16 e 14 kDa (CORREIA e COELHO, 1995).

O melhor potencial eletroquímico para *C. mollis* livre ou imobilizada foi obtido utilizando-se 1,0 mg/mL, a 5 e 10° C, 87 e 102 mV, respectivamente. O desenvolvimento de técnicas para definir a interface de parâmetros elétricos poderá dar informações sobre a adsorbância de grupos carregados na superfície da membrana celular, revelando interações em sistemas biológicos (SOUZA et al., 2003).

1.2.2. Atividade Biológica das Lectinas de *C. mollis*

Diante do vasto uso das lectinas vegetais, entre elas a *C. mollis*, das suas particularidades moleculares e estruturais, dos fatores que podem alterar o seu mecanismo de ação, torna-se extremamente importante a continuidade de estudos sobre seus efeitos no organismo, caracterizando os mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos nas respostas e efeitos celulares principalmente no que diz respeito a suas aplicabilidades terapêuticas e biotecnológicas.

Atividade Biológica	Referência
Livre e encapsulada em lipossomas, como adjuvante na terapia do câncer e atividade mitogênica de linfócitos.	BELTRÃO et al., 1988; BASZKIN et al., 2000; SADZUKA et al., 2002; ANDRADE et al., 2004; MACIEL et al. 2004.
Atividade imunoestimulatória.	OUDRHIRI et al., 1985; GHOSH et al., 1999; MELO et al., 2010a; MELO et al., 2010b; MELO et al., 2011a.
Ação anti-inflamatória e anti-helmíntica.	CECHINEL et al., 2001; FERNANDES, 2010; MELO et al., 2011c.
Reparação tecidual em animais normais e imunossuprimidos.	YASUOKA et al., 2003; MELO et al., 2003; ALBUQUERQUE et al., 2004; MELO et al., 2011b.

Quadro 2. Atividade Biológica das Lectinas de *C. mollis*.

1.3. Princípios da Irradiação

O termo radiação refere-se aos processos físicos de emissão e propagação de energia, através de fenômenos ondulatórios ou por meio de partículas dotadas de energia cinética. De uma forma mais prática, é a energia que se propaga de um

ponto a outro no espaço ou num meio material. A irradiação é o processo de aplicação desta energia a um material, como alimentos, medicamentos, cosméticos, entre outros com a finalidade de esterilizá-los ou preservá-los através da destruição de micro-organismos, parasitas, insetos e outras pragas (FRANCO e LANDGRAF, 1996; SPOLAORE et al., 2001).

Ao final dos anos 40 com a construção de reatores nucleares, houve um grande avanço na produção de radioisótopos principalmente do Cobalto-60, que teve primeiramente empregado na terapia de câncer (radioterapia). Com o aumento da disponibilidade do Cobalto-60 a Johnson & Johnson em meados dos anos 60 construiu na Inglaterra o seu primeiro irradiador com fontes radioativas e hoje tem suas instalações nos mais diversos países, incluindo no Brasil (RELA, 2001).

1.3.1. Esterilização

Segundo Relá (2001) geralmente nos processos de esterilização, os micro-organismos são inativados ou destruídos por agentes químicos ou físicos através de uma reação mononuclear de primeira ordem, onde a taxa de mortalidade pode ser representada no gráfico quando o logaritmo do número de sobreviventes é expresso em função de uma quantificação do tratamento aplicado.

A Figura 3 representa um exemplo empregando o processo de irradiação, onde é estabelecida a relação da inativação biológica dos micro-organismos em função da quantidade de radiação necessária para se conseguir o efeito desejado, quer seja uma redução da carga microbiana ou atingir um nível de segurança de esterilização utilizado internacionalmente como SAL (*Sterility Assurance Level*), definido em função da probabilidade de sobrevivência do micro-organismo quando submetido a uma determinada quantidade de radiação (RELA, 2001).

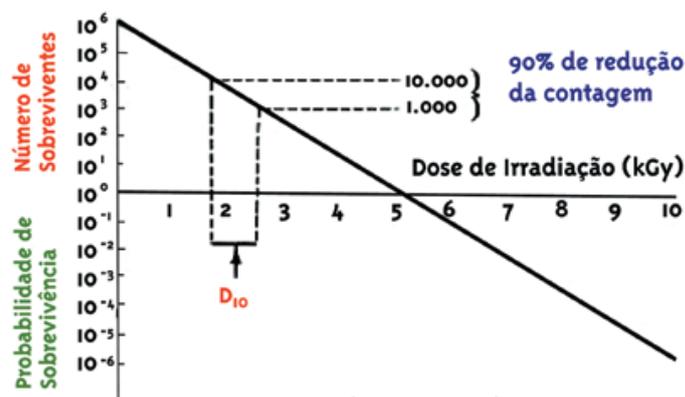


FIGURA 3 - Sobrevivência microbológica em função da dose de irradiação. Pode ser resultado de uma redução do número de micro-organismos ou por atingir um nível considerado seguro de esterilização (RELA, 2001).

De acordo com Relá (2001) na prática emprega-se para esterilização de produtos médicos e farmacêuticos um SAL de 10^{-6} , que representa a possibilidade de se encontrar um único micro-organismo viável em um universo de um milhão de amostras. O valor D_{10} apresentado significa a dose de radiação necessária a ser absorvida pelo material para permitir que a população inicial tenha uma redução de 90%, ou seja, reduzida de uma magnitude na escala logarítmica.

Os raios gama são originados de transições do núcleo de átomos que se encontram em um nível energético superior e instável (isótopo radioativo) passando para um nível de menor energia e estável. Existem dois tipos de radioisótopos: os naturais (Rádio, Urânio, Tório, etc) e os artificiais produzidos em reatores nucleares. Na categoria de isótopo artificial encontra-se o Cobalto-60, que é produzido através de uma reação nuclear onde o isótopo Cobalto-59 estável é bombardeado com nêutrons no interior de um reator e o seu núcleo ao receber um nêutron altera o seu número de massa, transformando-o no isótopo Cobalto-60 que é instável e radioativo (RELA, 2001).

1.3.2. Radiação Ionizante

Uma característica específica da radiação de alta energia é causar ionização no meio em que é absorvida, ou seja, é capaz de remover elétrons de suas órbitas em átomos ou moléculas. Por esta razão é denominada de radiação ionizante. As radiações ionizantes doam energia ao meio no qual se difundem, mediante múltiplos processos de interação. A energia doada é consumida na excitação e na ionização

de moléculas gerando reações químicas que podem provocar alterações permanentes na estrutura físico-química do material irradiado (SATIN, 1993).

1.3.3. Radiação Gama

A radiação gama e os raios X são semelhantes às ondas de rádio, às micro-ondas e aos raios de luz visível. Eles formam parte do espectro eletromagnético (Figura 4) na faixa de curto comprimento de onda e alta energia. Os raios gama e X são diferentes apenas nas suas origens, possuindo as mesmas propriedades e os mesmos efeitos sobre os materiais: raios X são produzidos por máquinas e raios gama são provenientes de reatores nucleares que promovem desintegrações espontâneas de radionucleotídeos (LUCA, 2003; FAO/IAEA, 2011).

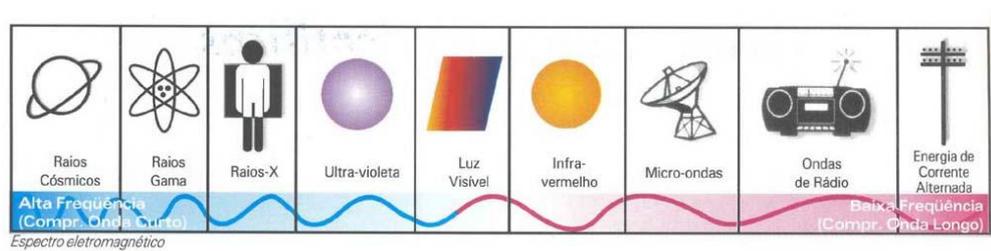


Figura 4: Espectro eletromagnético.

Fonte: Disponível em <<http://www.cena.usp.br/irradiacao/espectrodeondas.jpg>>.

A radiação gama foi empregada em escala comercial há mais de 40 anos. Esse tipo de radiação tem um largo uso em aplicações industriais, tais como: esterilização de materiais (cirúrgico, odontológico, de laboratório, entre outros), fármacos, cosméticos, matérias primas, alimentos, especiarias, coloração de vidros, pedras preciosas, melhoria de fibras sintéticas e de polímeros, produção de inoculantes para a agricultura, impregnação de madeiras e outros materiais (EMBRARAD, 2006).

Uma das vantagens da irradiação com raios gama sobre outros métodos usados para destruir micro-organismos nos materiais, é o seu alto teor de energia e grande poder de penetração e letalidade devido sua ação a nível celular. Seu alto poder de penetração é instantâneo, uniforme e profundo, permitindo o tratamento de produtos de tamanho, forma e densidades variáveis (URBAIN, 1989; EHLERMANN, 1990; FRANCO e LANDGRAF, 1996; HOBBS e ROBERTS, 1998).

O Cobalto-60 (Co^{60}) possui meia vida de 5,3 anos, o Césio-137 (C^{137}) também é um isótopo radioativo com meia vida de 30 anos, entretanto é pouco utilizado por sua escassez na natureza (SPOLAORE et al., 2001; FAO/IAEA, 2011).

O Co^{60} é o isótopo radioativo mais utilizado comercialmente em todo mundo por sua disponibilidade, custo, apresentar-se na forma metálica e ser insolúvel em água, proporcionando com isso maior segurança ambiental, esta última representando a sua aplicação mais importante e promissora, baseando-se em uma tecnologia limpa e processos restringidos a emissões de poluentes (EHLERMANN, 1990; CHMIELEWSKI e HAJI-SAEID, 2005).

Por ser a radiação uma forma de energia ela é expressa em ergs ou joules. A unidade de energia absorvida é o Gray (Gy), que equivale a um joule por quilograma (ou 10.000 erg/g) de material. A unidade mais usada é o kGy (kiloGray) que expressa a dose de irradiação. A dose de irradiação é a quantidade de energia absorvida por unidade de massa do material quando a energia passa através dele (LUCA, 2003; MAHAPATRA, 2005; FAO/IEAE, 2011).

Ao contrário do processo térmico, pouquíssima energia da radiação é consumida em aumentar a energia térmica das moléculas que a absorvem. Além disso, a energia necessária para esterilização pela radiação é de cerca de 50 vezes menor do que a requerida para esterilização pelo calor. Por isso esta é conhecida como “esterilização a frio” (CENA, 2006).

O processo de irradiação pode ser influenciado por fatores externos (temperatura, presença ou não de oxigênio e condição de armazenamento) e por fatores intrínsecos ao material, como estado físico, densidade, umidade, entre outras. Neste sentido, para cada produto a ser irradiado são estabelecidos procedimentos específicos, como por exemplo diferentes doses de radiação (MAHAPATRA, 2005; CENA, 2006).

A radiação gama tem um papel cada vez mais importante na fabricação de cosméticos e produtos medicinais (MAHER e DIETZ, 1981). A utilização de raios gama é um método alternativo para a esterilização/descontaminação de produtos e matérias-primas. No entanto, um dos principais problemas da irradiação é a ocorrência de novos radicais durante o processo. A irradiação não é um substituto para o não cumprimento de *Good Manufacturing Practices* (GMP). Na verdade, ela deve ser uma parte da GMP, ela não evita a recontaminação, a qualidade do

produto final é função da qualidade do produto original (REID e WILSON, 1993; JACOBS, 1995; BARBARIN et al., 2001; NAKI SIVRI et al., 2006).

O processo de radiação gama não pode resultar em um produto radioativo ou deixar qualquer radioatividade residual. Os micro-organismos são mortos como resultado da destruição de uma molécula vital ou por reação química dos compostos resultantes das radiações. A aplicação mais usada de tratamento é a radiação gama no controle dos níveis de contaminação microbiana de alimentos e muitos outros produtos, como medicamentos e cosméticos (DIETZ e MAHER, 1982).

Segundo a *United States Pharmacopeia* (USP), preparações de aplicação tópica não devem conter carga microbiana superior aos limites admissíveis. Em muitos casos, os organismos agressores em um produto cosmético são *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Ambos são especialmente suscetíveis à energia da radiação em doses muito baixas, que muitas vezes significa que o efeito da radiação sobre o produto é insignificante (DIETZ e MAHER, 1982). Os produtos cosméticos podem ser contaminados durante a fabricação por micro-organismos existentes no ambiente ou nas matérias-primas.

Não há dose certa de radiação na farmacopeia e orientações para a descontaminação de produtos cosméticos. No entanto, os limites microbiológicos são recomendados nas diretrizes para uma variedade de preparações cosméticas. Geralmente, a dose de radiação gama preferido para alcançar esses níveis varia entre 5 e 15 kGy (JACOBS, 1995). No entanto, para compreender e estudar profundamente a irradiação de doses mais elevadas (100 kGy) pode ser utilizada.

O Co^{60} é comumente utilizado para irradiação gama, podendo ser utilizado para cosméticos (produtos acabados). Visando a redução do teor microbiológico, o método não deixa resíduos que podem ser prejudiciais para os trabalhadores ou os consumidores (NAKI SIVRI et al., 2006).

A radiação gama pode penetrar o material de embalagem e embalagens fechadas contendo produtos acabados, e assim, destruir os micro-organismos existentes. Descontaminação por radiação gama está ganhando atenção cada vez maior na produção de cosméticos e medicamentos (NAKI SIVRI et al., 2006).

O uso da radiação gama provou ser uma técnica eficaz na redução da poluição ou contaminação da flora fúngica de plantas medicinais (PRADO et al., 2009).

É interessante notar que, em diferentes situações experimentais, caracterizados por diferentes espécies de plantas, materiais biológicos e, portanto, condições de tratamento também são diferentes, é necessário confirmar a estabilidade química da amostra, bem como a redução ou a inativação da carga microbiana nele contida (SATOMI et al., 2005; OLIVEIRA e COLAÇO, 2008; PRADO et al., 2009). Neste sentido o emprego da diversidade de formulações da Cramoll-1,4 representa um desafio constante da comunidade científica na busca da resolução de enfermidades, seja através da ação direta da proteína bioativa ou da sua ação indireta através de mecanismos que venham a agir como estimulantes ou facilitadores de processos que favoreçam a cura ou minimizem os efeitos de tais enfermidades.

2. HIPÓTESE

A formulação em gel irradiado possa manter as propriedades bioquímicas da Cramoll-1,4, podendo ser empregado como biofármaco na reparação tecidual *in vivo*, favorecendo o referido processo.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver uma formulação (gel) da Cramoll-1,4 associada a uma descontaminação por radiação gama, de forma a manter atividade hemaglutinante e permitir o seu uso como um produto biofarmacêutico.

Objetivos Específicos

- Avaliar a biodistribuição da lectina de Cramoll-1,4.
- Avaliar a ação do gel de Cramoll-1,4 irradiado na reparação óssea em ratas.

- Avaliar a eficácia da aplicação contínua da formulação em gel irradiado da Cramoll-1,4 no reparo tecidual de queimaduras cutâneas de segundo grau.

4. BIBLIOGRAFIA

AINOUZ, I.L. et al. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamniom seaforthii* and *Bryothamniom triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.7, p.15-19, 1995.

AFONSO-CARDOSO, S.R. et al. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. **Korean Journal Parasitology**, v. 45, n. 4, p. 255-266, 2007.

ALBUQUERQUE, E.R. et al. Topical treatment of cutaneous wounds in mice using *Cratylia mollis* lectin: Histopathological Analyses. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 30., 2004, Caxambu. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2004.

ALENCAR, N.M.N. et al. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, v. 8, p. 107-113, 1999.

ALENCAR, N.M.N. et al. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. **Protein Peptides Letters**, v. 11, p. 195-200, 2004.

ALENCAR, V.B.M. et al. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 1805-1814, 2005a.

ALENCAR, V.B.M. et al. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces *in vivo* and *in vitro* neutrophil migration. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 375–381, 2005b.

ALENCAR, V.B.M. et al. *Helianthus tuberosus* agglutinin directly induces neutrophil migration, which can be modulated/inhibited by resident mast cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 83, p. 659-666, 2005c.

AMBIENTEBRASIL. Biomass. Disponível em: <http://www.ambientebrasil.com.br>. Acesso em 15 out. 2011.

ANDRADE, J.L. et al. Lectin induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v. 194, n. 1, p. 98-102, 1999.

ANDRADE, C.A.S. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmacology**, v. 278, p.435-445, 2004.

ANURADHA, P.; BHIDE, S.V. An isolectin complex from *Trichosanthes anguina* seeds. **Phytochemistry**, v. 52, p. 751-758, 1999.

ARAGON, A.M. et al. Mitogenicity of isolectinas isolated from *Phaseolus vulgaris L. var. atropurpurea* in rat spleen lymphocytes. **Food Research International**, v. 26, n. 6, p. 451-453, 1993.

AUB, J.C. et al. Reactions of normal end tumor cell surfaces to enzymes, I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. Proceedings. **National Academy Sciences**, v.50, p. 613-619, 1963.

BANTEL, H. et al. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. **Cancer Research**, v. 59, n. 9, p. 2083-2090, 1999.

BARAUNA, S.C. et al. Antidepressant-like effect of from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 160-169, 2006.

BARBARIN N.; TILQUIN B.; DEHOFFMANN E. Radiosterilization of cefotaxime: investigation of potential degradation compounds by liquid chromatography electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A.**, v. 929, p. 51-61, 2001.

BARBOSA, T. et al. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673-678, 2001.

BARRAL-NETTO, M. et al. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunological Investigations**, v. 21, p. 297-303, 1992.

BARRAL-NETTO, M. et al. *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on Balb/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, v. 60, n. 4, p. 237-250, 1996.

BARRE, A. et al. The three-dimensional structure of lectins: a phonetic and phylogenetic tool for the Leguminosae. **Biochemical and Systematics and Ecology**, v. 22, n. 4, p.401-407, 1994.

BASZKIN, A. et al. *Cratylia mollis* lectin at the air-aqueous solution interface: Adsorption and lectin-lipid interactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 17, n.3, p. 191-201, 2000.

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

BERTHELOT, L. et al. Behavior of amphiphilic neoglycolipids at the air/solution interface Interaction with a specific lectin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31, n.5, p. 239-248, 1998.

BEUTH, J. et al. Importance of lectins for the prevention of bacterial infection and cancer metastases. **Glycoconjugate Journal**, v. 12, p. 1-6, 1995.

BEZERRA, S.F.; VIEIRA, V.L.A.; CARVALHO JR., L.B. Proteases no trato digestivo de peixes. **Biociência Ciência e Desenvolvimento**, v. 22, p. 26-29, 2001.

BHOWAL, J.; GUHA, A.K.; CHATTERJEE, B.P. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 12, p. 1973-1982, 2005.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.

BOURGUIGNON, S.C.; De SOUZA, W.; SOUTO-PADRON, T. Localization of lectin-binding sites on the surface of *Trypanosoma cruzi* grown in chemically defined conditions. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 110, n. 5, p. 527-534, 1998.

BRAZIL, V.; ENTLICHER, G. Complexity of lectins from the hard roe of perch (*Perca fluviatilis* L.). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 431-442, 1999.

CALVETE, J.J. et al. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1430, p. 367-375, 1999.

CALVETE, J.J. et al. The amino acid of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 57, p. 343-350, 2000.

CALVETE, J.J. et al. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochemical Journal**, v. 15, p.725-734, 2003.

CARVALHO, H.F. Aspectos moleculares e biológicos das lectinas. **Ciência e Cultura**, v. 42, p. 884-893, 1990.

CAVADA, B.S. et al. Primary structures and functions of plant lectins. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, n. 2, p.193-202, 1993.

CAVADA, B.S. et al. Purification and Characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v. 49, p. 675-680, 1998.

CAVADA, B.S. et al. Revisiting *proteus*: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of Diocleinae Subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**, v.2, p.123-135, 2001.

CECHINEL, Y.M.N. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity from *Cratylia mollis* lectin in mice. **VI Pharmatec**. Recife-PE 01: 167-168, 2001.

CENA. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Desenvolvido pela USP-CENA/PCLQ, 2002-2006. Apresenta textos sobre a divulgação da tecnologia de irradiação de alimentos e outros materiais. **Disponível em:** <<http://www.cena.usp.br/irradiacao/index.asp>>. Acesso em 26 set. 2006.

CHEUNG, A.H.; WONG, J.H.; NG, T.B. *Musa acuminata* (Del Monte banana) lectin is a fructosebinding lectin with cytokine-inducing activity. **Phytomedicine**, v. 16, n.6-7, p. 594-600, 2009.

CHMIELEWSKI, A.G.; HAJI-SAEID, M. IAEA programme in the field of radiation technology. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, v. 236, p. 38-43, 2005. Supplement B.

CHOI, S.; CHUNG, M. A review on the relationship between aloe vera components and their biologic effects. **Seminars in Integrative Medicine**, v.1, n.1 p. 53-62, 2003.

CHUNG, J.J. et al. Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from *Hawaiian box jellyfish* (*Carybdea alata*) venom. **Toxicon**, v. 39, n. 7, p. 981-990, 2001.

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, p. 1-6, 2000.

COELHO, M.B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 406-414, 2007.

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

CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Lectins carbohydrate recognition molecules: are they toxic? In: _____. **Recent trends in toxicology**. Kerala, India: Transworld Research Network, v. 37, p. 47–59, 2008.

DATTA, K. et al. A comparative study of the winged bean protease inhibitors and their interaction with proteases. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 939-959, 2001.

DIETZ G.R.; MAHER W.J. Radiation Sterilization in the Cosmetic Industry Update. **Cosmetics & Toiletries**, v. 97, p. 96-98, 1982.

DRICKAMER, K. Multiplicity of carbohydrate interactions. **Nature Structural Biology**, v.2, p.437-439, 1995.

EHLERMANN, D.A.E. Food irradiation. In: SPIESS, W.E.L.; SCHUBERT, H. (Ed.). **Engineering and food: Preservation process and related techniques**. London: Elsevier Applied Science, 1990. v.2, p. 760-773.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 12, 462-467, 1997.

EMBRARAD. Empresa Brasileira de Radiações. Desenvolvido pela Embrarad, Apresenta textos sobre radiação gama em alimentos, produtos farmacêuticos, material médico, cosméticos e fitoterápicos. **Disponível em:** <<http://www.embrarad.com.br/radiacao.asp>>. Acesso em 26 set. 2006.

FAO/IAEA. Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture International Atomic Energy Agency. **Facts About Food Irradiation**. 1999. Disponível em: <<http://www.iaea.org/icgfi/documents/foodirradiation.pdf>>. Acesso em 13 out. 2011.

FERREIRA, R.R. et al. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from Brazilian beans and Concanavalina A. **Inflammation Research**, v. 45, p. 442-447, 1996.

FERNANDES, M.P. **Atividades de lectinas de sementes de *Cratylia mollis* sobre a função mitocondrial e viabilidade de *Trypanosoma cruzi***. 2010. 159f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Médica) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Editora Atheneu, p. 134-139, 1996.

FREIRE, M.G. et al. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

GABIUS, H.J.; GABIUS, S. **Glycosciences: Status and perspectives**. 2. ed. New York: Wiley-VCH, p. 659, 2002.

GASTMAN, B. et al. A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 1, p. 263-271, 2004.

GERLACH, D. et al. Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. **FEM Microbiology Letters**, v. 10579, p. 61-68, 2002.

GHOSH, S. et al. Saracin: A lectin from *Saraca indica* seed integument induces apoptosis in human T-lymphocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 371, n. 2, p. 63-168, 1999.

GOLDSTEIN, I.J. et al. What should be called a lectin? **Nature**, p. 255-266, 1980.

GOMES, J.C. et al. Histamine release induced by glucose (manose)-specific lectins isolated from Brazilian beans: comparison with Concanavalin A. **Agents Actions**, v. 41, p. 132-135, 1994.

GRANGEIRO, T.B. et al. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia braziliensis* seeds. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v.248, p.43-48, 1997.

GUZMAN-PARTIDA, A.M. et al. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. **Biochimie**, v. 86, p. 4-5, p. 335-342, 2004.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos**. São Paulo, Livraria Varela, p. 137-139, 221, 278, 1998.

HOCHLEITNER, E.O. et al. Analysis of isolectins on non-porous particles and monolithic polystyrene-divinylbenzene based stationary phases and electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, p. 223-224: 519-526, 2003.

HONG, M. et al. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 752, p. 207-216, 2001.

HOUGHTON, P.J. et al. *In vitro* tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 100–107, 2005.

INBAR, M.; SACHS, L. Interaction of the carbohydrate-binding protein concavalin A with normal and transformed cells. **Proceedings National Academy Sciences**, v. 63, p. 1418-1425, 1969.

ITO, Y. Occurrence of lectins in leaves and flowers of *Sophora japonica*. **Plant Science**, v. 47, p. 77-82, 1986.

ISIDRO, R. et al. Ação das lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. Sob comportamento da saúva do nordeste (*Atta opaciceps* Borgmeier, 1939). **Revista da Faculdade de Agronomia de Maracay**, v.25, p. 77-86, 2001.

JACOBS G.P. A review of the effect of gamma irradiation on pharmaceutical materials. **Journal of Biomaterials Applications**, v.10, p. 61-72, 1995.

JIMBO, M. et al. The D-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 125 (B), p. 227-236, 2000.

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

KAKU, H.; PEUMANS, W.J.; GOLDSTEIN, I.J. Isolation and characterization of a second lectin (SNAII) present in elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 277, n. 2, p. 255-262, 1990.

KAUR, M. et al. 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**, v. 445, n. 1, p. 156-165, 2006.

KAVALALI, G. et al. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 1-5, 2002.

KAWAGISHI, H. et al. A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 1, p. 7-10, 1997.

KAWAGISHI, H. et al. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 1, p. 53-58, 2001.

KENNEDY, J.F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

KIPATRICK, D.C. Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. **Molecular Biotechnology**, v. 11, p. 55-65, 1999.

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

KONOZY, E.H. et al. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, n. 2, p. 222-229, 2003.

LAWRENCE, M.J. Surfactant systems – their use in drug-delivery. **Chemical Society Reviews**, v. 23, n. 6, p. 417-424, 1994.

LEI, H.Y.; CHANG, C.P. Induction of autophagy by Concanavalin A and its application in antitumor therapy. **Autophagy**, v. 3, n. 4, 402-404, 2007.

LIMA, V.L.M. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, p. 27-32, 1997.

LIS, H.; SHARON, N. **Lectins in higher plants**. In: Marcus A, editor. *The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise*. 6 ed, p.371-447, 1981.

LIU, B. et al. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 482, n. 1-2, p. 1-6, 2009.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 198-208, 2002.

LOPES, G.C. et al. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 265–272, 2005.

LUCA, G.C. **Energia Ionizante: Qualidade e Segurança para Alimentos**. In: I Simpósio sobre Qualidade da Carne. Jaboticabal, 2003.

LYU, S.Y. et al. Involvement of caspase-3 in apoptosis induced by *Viscum album* var. *coloratum* agglutinin in HL-60 cells. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 534-541, 2001.

MACHUKA, J.S. et al. Isolation and partial characterisation of galactose-specific lectins from *African yam* beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 721-728, 1999.

MACIEL, E.V.M. et al. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals Journal**, v. 32, p. 57–60, 2004.

MAHER W.J.; DIETZ G.R. Radiation sterilization in the cosmetic industry. **Cosmetic & Toiletries**, v. 96, p. 53-58, 1981.

MANDAL, D.K. et al. Purification and characterization of three isolectins of soybean agglutinin. Evidence for C-terminal truncation by electrospray ionization mass spectrometry. **European Journal of Biochemistry**, v. 221, n. 1, p. 547-553, 1994.

MACIEL, E.V.M. et al. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, p. 57-60, 2004.

MAHAPATRA, A.K.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; JULSON, J.L. Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: a Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n.45, p.447-461, 2005.

MELO, C.M.L. et al. Topical use of *Cratylia mollis* lectin in wound healing in mice. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, XXX SBBq. **Anais...**, p. 112, 2003.

MELO, C.M.L. et al. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 342, p. 163–169, 2010a.

MELO, C.M.L. et al. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1631-1636, 2010b.

MELO, C.M.L. et al. Mitogenic response and cytokine production induced by Cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, p. 112–121, 2011a.

MELO, C.M.L. et al. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, p. 113–119, 2011b.

MELO, C.M.L. et al. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*. **Acta Tropical**, v. 118, p. 152–158, 2011c.

MO, H. Isolation and characterization of a N-acetyl-D-galactosamine-binding lectin from *Dutch iris* bulbs which recognizes the blood group A disaccharide (GalNAc alpha 1-3Gal). **Journal of Biology Chemistry**, v. 269, n. 10, p. 7666-7673, 1994.

MO, H. et al. Purification and characterization of a Neu5Ac a 2–6 Gal b-1–4 Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **Journal of Biology Chemistry**, v. 275, 10623–10629, 2000.

MOREIRA, R.A. et al. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211-218, 1991.

MOREIRA, R.A. et al. Lectins and the chemotaxonomy of the sub-tribe Diocleinae (Leguminosae-Phaseoleae). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 7, n. 1, p. 7-14, 1995.

MOURE, A.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H. Extraction and functionality of membrane-concentrated protein from defatted *Rosa rubiginosa* seeds. **Food Chemistry**, v. 74, p. 327-339, 2001.

NAKI SIVRI, N. et al. Descontamination of cosmetics products and raw materials by gamma irradiation. **FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, p. 189-198, 2006.

NG, T.B.; YU, Y.L. Isolation of a novel heterodimeric agglutinin from rhizomes of *Smilax glabra*, the Chinese medicinal material tufuling. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 3, p. 269-277, 2001.

NICOLSON, G.L.; BLAUSTEIN, J. The interaction of *Ricinus communis* agglutinin with normal and tumor cell surface. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 266, p. 543-547, 1972.

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

NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: a inhibitor of mitosis in cultures of normal human leucocytes. **Cancer Research**, v. 20, p. 462-464, 1960.

OHBA, H.; BAKALOVA, R.; MURAKI, M. Cytoagglutination and cytotoxicity of Wheat Germ Agglutinin isolectins against normal lymphocytes and cultured leukemic cell lines--relationship between structure and biological activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1619, n. 2, p. 144-150, 2003.

OLIVEIRA, M.D. et al. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 371-376, 2008.

OLIVEIRA, R.S.; COLAÇO, W. Radiossensitividade gama de extrato de *Maytenus ilicifolia*: desenvolvimento de protocolo para controle de qualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 235-239, 2008.

OSHIKAWA, K. Purification and characterization of a basic amino acid-specific peptidase from seeds of jack bean (*Canavalia ensiformis*). **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, v. 64, n. 10, p. 2186-2192, 2000.

OUDRHIRI N. et al. Mechanism of accessory cell requirement in inducing IL 2 responsiveness by human T4 lymphocytes that generate colonies under PHA stimulation. **Journal Immunology**, v. 135, n. 3, p. 1813-1818, 1985.

PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113-119, 1992.

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

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

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 209-258, 1998b.

PEUMANS, W.J. et al. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 491, p. 27-54, 2001.

PODOLSKY, M.J. Characterization of an equine mannose-binding lectin and its roles in disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, n. 3, p. 928-936, 2006.

POLHILL, R.M. et al. Advances in Legume Systematics, Part 1. **Royal Botanic Gardens**, Kew, UK, p. 1-25, 1981.

PONCHEL, G.; IRACHE, J. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, n. 2-3, p. 191-219, 1998.

PORTO, C.S. et al. Avaliação da atividade cicatrizante da lectina de *Parkia pendula* em feridas isquêmicas experimentais. **Caminhos da Ciência**, Recife: EDUFRPE, v.1, p. 133, 2006.

PRADO, G. et al. Efeito da irradiação na microbiota fúngica de plantas medicinais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 5, p. 1372-1378, 2009.

QUEIROZ, L.P.; CORADIN, L. Biogeografia de *Cratylia* e áreas prioritárias para coleta. In: PIZARRO, E.A.; CORADIN, L. (Ed.). **Potencial del género *Cratylia* como leguminosa forrajera: Memorias del Taller sobre *Cratylia* realizado del 19 al 20 de julio de 1995**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN/CPAC/CIAT, p. 11-15, 1995.

RAMOS, M.V. et al. Interaction of lectins from sub-tribe Diocleinae with specific ligands. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, p.193-199, 1999.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. **Plant Science**, v. 139, p. 141-148, 1998.

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

REID, B.D.; WILSON, B.K. Radiation processing technology for cosmetics. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 42, p. 595-596, 1993.

REGO, E.J. et al. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry**, v. 60, n. 5, p. 441-446, 2002.

RINI, J.M. Lectin structure. **Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 34, p. 551-557, 1995.

RELA, P.R. Utilização da radiação ionizante na esterilização de produtos médicos e farmacêuticos. **Artigo Técnico**. Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação (SBCC), set/out., p. 10-16, 2001.

RODRIGUEZ, D. et al. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-

binding lectins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, p. 823-826, 1992.

SÁ, R.A. et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 3, p. 300-306, 2009.

SADZUKA, Y. et al. Effects of intraperitoneal administration of liposomes and methods of preparing liposomes for local therapy. **Toxicology Letters**, v. 126, p. 83-90, 2002.

SANZ-APARICIO, J. et al. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectins suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v. 405, p.114-118, 1997.

SATIN, M. **Food Irradiation**. A Guidebook. Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster. USA, 146 p., 1993.

SATOMI, L.C.; SORIANI, R.R.; PINTO, T.J.A. Descontaminação de drogas vegetais empregando irradiação gama e óxido de etileno: aspectos microbianos e químicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 4, p. 445-450, 2005.

SCHIRATO, G.V. et al. Efeito da lectina de *Canavalia brasiliensis* no tratamento tópico de feridas cutâneas experimentais em camundongos. In: REUNIÃO REGIONAL NORDESTE DA SBBQ E 2ND INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MACROMOLECULES BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, 2., 2004, Recife. **Proceedings...** Recife: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2004. p. 159-161.

SCHIRATO, G.V. et al. (2006) apoud PORTO, C.S. et al. Avaliação da atividade cicatrizante da lectina de *Parkia pendula* em feridas isquêmicas experimentais. **Caminhos da Ciência**, Recife: EDUFRPE, v.1, p. 133, 2006.

SENGUPTA, S. et al. Phytolectins: natural molecules with immense biotechnological potential. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 35, n. 2, p. 103-110, 1997.

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

SHARON, N.; LIS, H. A century of lectin research (1888-1988). **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, p. 483-487, 1987.

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

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

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glicobiology**, v. 14, p. 53R-64R, 2004a.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins. 2. ed, **Heidelberg: Springer**, 2004b. 470 p.

SHIBUYA, N. et al. Carbohydrates binding properties of the stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizome lectins. **Archives of Biochemistry and Biophysics: ABB**, v. 249, p. 215-224, 1986.

SINGH, R.S. et al. Lectins: sources, activities and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 145-178, 1999.

SINGH, J. et al. A novel mitogenic and antiproliferative lectin from a wild cobra lily, *Arisaema flavum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 318, p. 1057-1065, 2004.

SOUSA, F.B., OLIVEIRA, M.C.d. Avaliação agrônômica do gênero *Cratylia* na região semi-árida do Brasil. In: PIZARRO, E.A.; CORADIN, L.(Ed.). **Potencial del género *Cratylia* como leguminosa forrajera: Memorias del Taller sobre *Cratylia* realizado del 19 al 20 de julio de 1995**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN/CPAC/CIAT, 1995. p. 50-52.

SOUZA, S.R. et al. A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu beans) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, n. 2, p.191-193, 2001.

SOUZA, S.R. et al. Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 255–258, 2003.

SOUZA, G.A.d. et al. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. **Glycobiology**, v.13, p 961-972, 2003.

SPOLAORE, A.J.G.; GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Irradiação de Alimentos. In: GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo, Livraria Varela, p. 421-442, 2001.

SPRONG, T. et al. Mannose-binding lectin is a critical factor in systemic complement activation during meningococcal septic shock. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 9, p. 1380-1386, 2009.

STRYER L. **Bioquímica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

SUMMER, J.B; HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with Concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v.32, p.227-237, 1936.

SUROLIA, A.; SHARON, N.; SCHWARZ, F.P. Thermodynamics of monosaccharide and disaccharide binding to Erythrina corallodendron lectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 30, p. 17697, 17703, 1996.

TAVARES, G.A. et al. Crystallization and preliminar X-ray studies on the lectin from the seeds of *Cratylia mollis*. **Acta Crystallographica Section D**, v. 52, p. 1046-1047, 1996.

TSIVILEVA, O.M.; NIKITINA, V.E.; LOSHCHININA, E.A. Isolation and characterization of *Lentinus edodes* (Berk.) singer extracellular lectins. **Biochemistry (Mosc)**, v. 73, n. 10, p. 1154-1161, 2008.

URBAIN, W.M. Irradiação de Alimento: Os cinquenta anos passados como o prologue o amanhã. **Alimento Technology**, v. 43, n. 7, p. 76-92, 1989.

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

VAN PARRIJS, J. et al. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevein brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, n.2, p. 258-262, 1991.

VEGA, N.; PEREZ, G. Isolation and characterisation of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. **Phytochemistry**, v. 67, n. 4, p. 347-355, 2006.

VERCESI, A.E. et al. Ca²⁺-dependent NAD(P)⁺-induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 154, n. 3, 15 aug, p. 934-941, 1988.

VIEIRA, L.A.P. et al. The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 7, p. 1071-1079, 2004.

WANG, H.X.; NG, T.B. Purification of castamollin, a novel antifungal protein from chinese chestnuts. **Protein Expression & Purification**, v. 32, p. 44-51, 2003.

WEIS, W.I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review Biochemistry**, v. 65, p. 441-473, 1996.

WONGKHAM, S. Isolectins from seeds of *Artocarpus lakoocha*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1331-1334, 1995.

WU, A.M. et al. Carbohydrate specificity of an agglutinin isolated from the root of *Trichosanthes kirilowii*. **Life Sciences Journal**, v. 66, n. 26, p. 2571-2581, 2000.

YASUOKA, T. et al. The effects of lectins on indomethacin-induced small intestinal ulceration. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p. 231-237, 2003.

Avaliação *in vitro* da influência da radiação gama em uma formulação em gel da lectina de *Cratylia mollis*

Maria Helena Madruga **Lima-Ribeiro**^{1,2}, Ralph **Santos-Oliveira**^{3*}, Mauricélia Firmino de **Santana**⁴, Terezinha de Jesus Andreoli **Pinto**⁵, Irene Satiko **Kikuchi**⁵, Luana Cassandra Breitenbach Barroso **Coelho**⁶, Maria Tereza dos Santos **Correia**⁶, Ana Maria dos Anjos **Carneiro-Leão**^{2,7}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;

²Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;

³Instituto de Engenharia Nuclear, Divisão de Radiofarmácia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

⁴Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, PE;

⁵Departamento de Farmácia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil;

⁶Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;

⁷Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

*Autor para Correspondência: Endereço: Rua Hélio de Almeida, 75, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil. CEP. 21941-906. E-mail:roliveira@ien.gov.br

RESUMO

Lectina de Cramoll-1,4, obtida a partir de sementes de *Cratylia mollis* (feijão camaratu) foi estruturalmente caracterizada, biologicamente e farmacologicamente, porém seu uso como um produto biofarmacêutico não está muito bem documentada. O objetivo deste estudo é propor uma formulação biofarmacêutica de lectina de Cramoll-1,4, do ensaio de suas propriedades hemaglutinantes *in vitro*, bem como o uso da radiação gama como um processo contínuo de descontaminação para esta formulação. Foi feita a extração e purificação da Cramoll-1,4, foi desenvolvida uma formulação em gel utilizando-se Carbopol[®] como veículo, nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 600 µg que foi irradiada com raios gama de Co⁶⁰ em uma dose de 7,549 kGy h⁻¹. A formulação proposta na concentração de 300 µg produziu um aumento das unidades hemaglutinantes da Cramoll-1,4, associado ao efeito sinérgico causado pela radiação gama. Considerando-se a utilização diversificada das lectinas, fatores específicos moleculares e estruturais, bem como as alterações decorrentes da sua formulação, concentração, irradiação e via de administração é de extrema importância dar continuidade aos estudos *in vitro*, para posterior aplicação *in vivo* a fim de caracterizar os mecanismos fisiológicos e processos moleculares envolvidos na resposta e os efeitos celulares.

Palavras-chave: Radiação gama; produtos naturais; atividade hemaglutinante; Cramoll-1,4.

ABSTRACT

Lectin Cramoll-1,4, obtained from *Cratylia mollis* seeds (beans camaratu) was structurally characterized, biologically and pharmacologically, but its use as a biopharmaceutical is not well documented. The objective of this study is to propose a biopharmaceutical formulation lectin Cramoll-1,4, test their hemagglutinating properties *in vitro* as well as the use of gamma radiation as a continuous process of decontamination formulation. It was made of the extraction and purification Cramoll-1,4, was developed a gel formulation using Carbopol® as a vehicle, at concentrations of 50, 100, 200, 300 and 600 µg was irradiated with ⁶⁰Co gamma rays in a dose of 7.549 kGy h⁻¹. The proposed formulation at a concentration of 300 µg produced an increase in the hemagglutinating units Cramoll-1,4 due to the synergistic effect caused by gamma radiation. Considering the diverse use of lectins, specific molecular and structural factors, as well as changes resulting from its formulation, concentration, irradiation and route of administration is of utmost importance to continue the studies *in vitro*, for subsequent application *in vivo* to characterize the physiological and molecular processes involved in the response and cellular effects.

Keywords: Gamma radiation; natural products; hemagglutinating activity; Cramoll-1,4.

INTRODUÇÃO

Camaratu ou feijão Camaratuba (*Cratylia mollis*) é uma forrageira do semi-árido do Nordeste do Brasil. Produtos naturais de plantas ou animais ainda são fontes importantes na terapêutica medicinal. Contudo, são necessários estudos farmacológicos e toxicológicos cuidadosos para comprovar sua eficácia terapêutica e segurança [1].

Lectinas são proteínas obtidas na natureza, frequentemente encontradas na superfície celular ou em partículas intracelulares [2]. Elas possuem sítios de ligação específicos para os carboidratos e têm a capacidade de interagir com as moléculas

dos fluidos biológicos e aquelas presentes na superfície celular [3]. Lectinas podem substituir ligantes naturais e ativar respostas celulares através de diferentes caminhos de sinalização intracelular ou endocitose de compostos formados [4,5].

Formas moleculares da lectina de sementes de *C. mollis* (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4), foram amplamente purificadas e caracterizadas [6-8]. Cramoll 1,2 e Cramoll 4 são lectinas que ligam especificamente a glicose/manose, enquanto Cramoll 3 é uma glicoproteína galactose específica. As preparações que contenham isoformas (Cramoll-1,4) e isolectinas (Cramoll 1,2,3), bem como Cramoll 1 foram analisadas estruturalmente e utilizadas em aplicações biotecnológicas diversas [8, 9-16].

Andrade et al. [11] mostraram a atividade anti-tumoral usando lipossomas livres ou encapsuladas contendo a Cramoll-1,4. O uso terapêutico das lectinas no processo de reparo tecidual ainda é pouco estudado. Yasuoka et al. [16] utilizaram lectinas de *Phaseolus vulgaris* (PHA) e lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis*, Concanavalina A (Con A) em úlceras intestinais induzidas por indometacina em ratos, observou-se um reparo tecidual mais rápido dos animais tratados com lectinas.

A utilização de raios gama é um método alternativo para a esterilização/descontaminação de produtos e matérias-primas. No entanto, um dos principais problemas da irradiação é a ocorrência de novos radicais durante o processo. A irradiação não é um substituto para o não cumprimento de *Good Manufacturing Practices* (GMP). Na verdade, ela deve ser uma parte da GMP [17-20].

O processo de radiação gama não pode resultar em um produto radioativo ou deixar qualquer radioatividade residual. Os micro-organismos são mortos ou como resultado da destruição de uma molécula ou por reação química dos compostos resultantes das radiações. A aplicação mais usada de tratamento é a radiação gama no controle dos níveis de contaminação microbiana de alimentos e muitos outros produtos, como medicamentos e cosméticos [17].

Segundo a *United States Pharmacopeia* (USP), preparações de aplicação tópica não devem conter carga microbiana superior aos limites admissíveis. Em muitos casos, os organismos agressores em um produto cosmético são *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Ambos são especialmente suscetíveis à energia da radiação em doses muito baixas, que muitas vezes significa que o

efeito da radiação sobre o produto é insignificante [21]. Os produtos cosméticos podem ser contaminados durante a fabricação por micro-organismos existentes no ambiente ou nas matérias-primas.

Na farmacopeia os limites microbiológicos são recomendados nas diretrizes para uma variedade de preparações cosméticas. Geralmente, a dose de radiação gama preferido para alcançar esses níveis varia entre 5 e 15 kGy [18]. No entanto, para compreender e estudar profundamente a irradiação em doses mais elevadas (100 kGy) pode ser utilizada.

A radiação gama pode penetrar o material de embalagem e embalagens fechadas contendo produtos acabados e assim, destruir os micro-organismos existentes. Descontaminação por radiação gama está ganhando atenção cada vez maior na produção de cosméticos [20].

O Co^{60} é comumente utilizado para irradiação gama, podendo ser utilizado para cosméticos. Visando a redução do teor microbiológico, este método da irradiação gama não deixa resíduos que podem ser prejudiciais para os trabalhadores ou os consumidores. O uso do Co^{60} também provou ser uma técnica eficaz na redução da poluição ou contaminação da flora fúngica de plantas medicinais [22].

É interessante notar que, em diferentes situações experimentais, caracterizadas por diferentes espécies de plantas, materiais biológicos e, portanto, condições de tratamento também diferentes, é necessário confirmar a estabilidade química da amostra, bem como a redução ou a inativação da carga microbiana nele contida [22-24].

O objetivo do presente estudo foi desenvolver uma formulação (gel) da Cramoll-1,4 sob efeito de descontaminação por radiação gama para uso como um produto biofarmacêutico, mantendo as propriedades hemaglutinantes da lectina.

METODOLOGIA

Purificação da Lectina

Um extrato de sementes de *C. mollis* (10% v/v preparada em NaCl 0,15 M) foi fracionado com sulfato de amônio (40-60% v/v) e a fração obtida foi submetida à cromatografia de afinidade em Sephadex G-75. Cramoll-1,4 foi bioseletivamente

eluída com uma solução de 0,3 M D-glicose em NaCl 0,15 M, dialisada com NaCl 0,15 M, durante 24 horas e liofilizada segundo Correia & Coelho [7].

Atividade Hemaglutinante

Atividade Hemaglutinante (HA) é definida como a menor diluição da amostra que resulta em hemaglutinação [7]. Eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído foram obtidos conforme descrito por Bing et al. [25]. Foi empregada a dose total de 15 kGy para todas as amostras irradiadas. Todas as preparações foram analisadas para a atividade de hemaglutinação e o teor de proteínas foi determinado por espectrofotometria de acordo com Lowry et al. [26], utilizando uma curva de calibração de BSA (*Bovine Serum Albumin*) como padrão (0 - 500 mg/ml). Para cada amostra a avaliação da HA foi feita em triplicata.

Formulação em Gel

Para todos os experimentos, o Carbopol[®] foi usado como um veículo (pó de polímero). O polímero foi suspenso em solução tampão de ácido bórico (pH 6,0) a 25° C. Este pH foi escolhido porque é semelhante ao pH da pele. Soluções de Cramoll-1,4 foram adicionadas ao polímero em pó e estas foram dissolvidas em solução tampão de ácido bórico em quantidades necessárias para atingir concentrações de Cramoll-1,4 de finais de 50, 100, 200, 300 e 600 µg em 100 µg de gel. Embora nenhum conservante tenha sido utilizado, foi feito o uso de álcool 96° GL.

Irradiação do Gel

A irradiação foi realizada em temperatura ambiente usando Co⁶⁰ células Gama 220 disponíveis na Universidade Federal do Rio de Janeiro, a uma taxa de dose de 7, 549 kGy h⁻¹. As amostras (Cramoll-1,4 e formulação em gel de Cramoll-1,4) em frascos de vidro foram irradiadas com doses de 10 e 100 kGy. Amostras irradiadas foram utilizadas como controle para detectar alterações físico-químicas, biológicas e microbiológicas resultantes da ação da radiação ionizante sobre os produtos.

Análise Reológica

As medidas reológicas foram realizadas em um viscosímetro Brookfield, modelo LVIII, com cone-placa CP52 com sensor do eixo, com taxa de corte de 0 a 200 (Hz) e temperatura controlada a 25 °C com termostato TC501.

Atividade Antimicrobiana *in vitro*

Cepas e Meios

As seguintes cepas de micro-organismos foram utilizadas para desenvolver este trabalho: *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. As bactérias foram cultivadas em Ágar tripticase de soja e leveduras em Agar Sabouraud Dextrose.

Validação do Método

Inócuo de cada micro-organismo teste foi elaborado pela diluição seriada da suspensão de estoque. Em seguida 100 µL de cada organismo teste (Tabela 1) foram transferidos para placas de *Petri* contendo 100 µL do gel excipiente. Os meios de cultura (15 mL) foram adicionados a cada placa. Os fungos foram incubados a $22,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$ e as bactérias em $32,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$. *A. niger* foi incubado durante 6-10 dias e leveduras durante 18-24 h. Todos os testes foram realizados em triplicata e só mais de 70% de níveis de recuperação foram considerados.

Tratamento das Amostras

Quantidades de 1,0 g de amostra foram adicionadas em frascos esterilizados que foram propositalmente contaminados com 100 µL de cada cepa de micro-organismo (Tabela 2) separados e submetidos a doses de 10 e 100 kGy de radiação gama provenientes de fonte de Co^{60} . Após esse tratamento, 1 mL de cada amostra foi transferido para placa de *Petri* e preparado para contagem microbiana (Tabela 1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise microbiológica (Tabela 1) demonstrou que todos os micro-organismos foram recuperados de forma eficiente, promovendo a validação do método empregado para avaliar o efeito de raios gama nas amostras. A Tabela 2 mostra que doses de 10 e 100 kGy de raios gama foram eficientes para o tratamento de amostras previamente contaminadas. Estes resultados corroboram com a literatura internacional sobre o uso da irradiação para a descontaminação. Os resultados sugerem o uso rotineiro de radiação gama para a descontaminação de cosméticos e biofármacos, o que está de acordo com as observações de Maher & Dietz [27] que afirmam que a irradiação tem papel cada vez mais importante na descontaminação de cosméticos e produtos medicinais.

Tabela 1 – Recuperação de micro-organismos inoculados em amostras de gel.

Micro-organismo	Quantidade de Micro-organismos Inoculados (100 µL)	Recuperação de Micro-organismos
<i>A. niger</i>	29 UFC	84,3 %
<i>C. albicans</i>	8 UFC	100,0 %
<i>E. coli</i>	49 UFC	89,8 %
<i>P. aeruginosa</i>	76 UFC	100,0%
<i>S. aureus</i>	44 UFC	100,0 %
<i>B. subtilis</i>	49 UFC	91,5 %

Tabela 2 – Efeito dos raios gama nas amostras contaminadas.

Micro-organismo	Dose de Raios Gama		
	Nenhum Tratamento (quantidade inicial do inócuo)	10 KGy	100 KGy
<i>A. niger</i>	8,4 x 10 ³ UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g
<i>C. albicans</i>	7,1 x 10 ³ UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g
<i>E. coli</i>	5,8 x 10 ⁴ UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g
<i>P. aeruginosa</i>	7,6 x 10 ⁴ UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g
<i>S. aureus</i>	5,4 x 10 ⁴ UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g
<i>B. subtilis</i>	10 ⁶ UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g

Os resultados da análise reológica foram importantes, especialmente após a irradiação do gel. A análise (Figura 1) mostra a viscosidade aparente versus a taxa de cisalhamento para as amostras não irradiadas e irradiadas com 10 e 100 (kGy),

podendo ser observado que, para todas as amostras, a viscosidade aparente diminuiu com o aumento da dose de irradiação a uma taxa de cisalhamento constante, assim para uma dose de irradiação de 100 kGy a viscosidade foi 20mPa.s (2,295 N/m) para todas as amostras. O que indica que a dose de 100 kGy não é recomendada uma vez que ela reduz a viscosidade do gel, que representa um dos fatores mais importantes no emprego desta formulação pois permite uma maior sedência do material ao tecido em estudo.

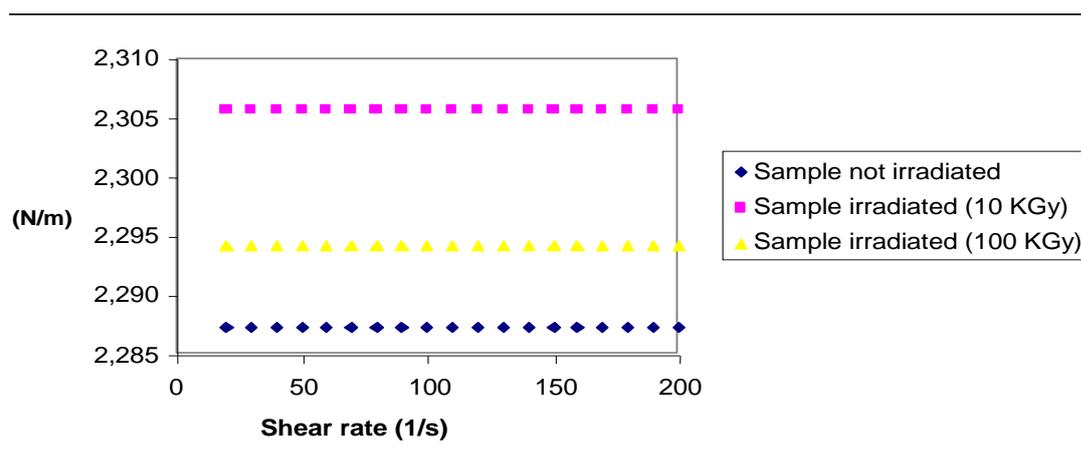


Figura 1 – Análise reológica do gel mediante diferentes condições. Podendo ser observada a viscosidade aparente, que é aquela medida em um único ponto através de cisalhamento constante. Observando-se uma redução da viscosidade com o aumento da dose de irradiação.

Diversos aspectos fazem da formulação em gel uma apresentação ideal para o tratamento de lesões teciduais, tais como: biocompatibilidade, ausência de toxicidade, biodegradabilidade, aderência e absorção [28,29].

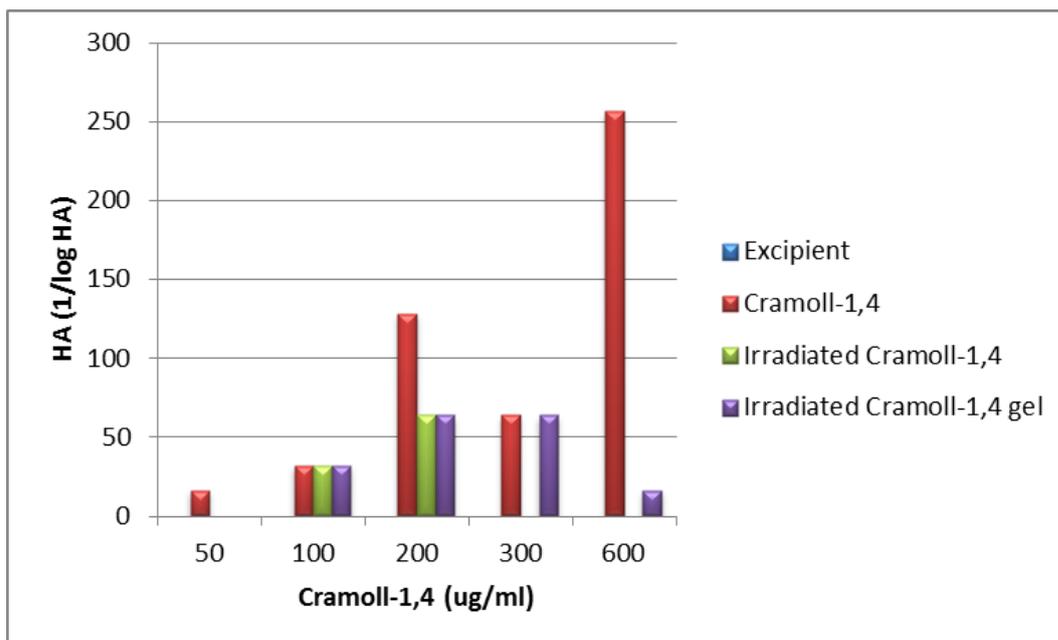


Figura 2 - Avaliação da atividade hemaglutinante da Cramoll-1,4 nativa e em formulação em gel sob efeito de radiação na dose de 15 kGy. Os dados referem-se a comparações das amostras irradiadas ou não dentro de uma mesma concentração.

O gel excipiente, como desejado, não apresentou atividade hemaglutinante. Entretanto, foi observado que a Cramoll-1,4, na concentração de 50 μg , tanto a Cramoll-1,4 nativa quanto a formulação sob o efeito da radiação perderam sua atividade hemaglutinante. No entanto à medida que aumentou a concentração da lectina (100 μg) estas alterações não foram observadas. Entretanto, na concentração de 200 μg , houve uma redução na atividade hemaglutinante na Cramoll-1,4 nativa e na formulação irradiada, no entanto, permitiu a manutenção de um bom título para a atividade hemaglutinante.

A atividade hemaglutinante da Cramoll-1,4 gel em uma concentração de 300 μg foi mantida após a irradiação enquanto a Cramoll-1,4 nativa a perdeu. A formulação irradiada na concentração de 600 μg de Cramoll-1,4 alcançou um nível indesejável de HA diferente de zero, como ocorreu com a forma nativa irradiada. Isto sugere que o gel tem um efeito “protetor” sobre a Cramoll-1,4, especialmente contra hidrólise, podendo manter a atividade da lectina por mais tempo.

Estes dados sugerem que a irradiação gama na dose de 15 kGy, na concentração de 300 μg pode ser utilizada como processo alternativo para o controle microbiológico de medicamentos com base em Cramoll-1,4 e na manutenção de um título satisfatório de atividade hemaglutinante.

De acordo com os resultados obtidos *in vitro*, é possível elaborar um estudo *in vivo*, assim será possível avaliar o efeito desta formulação no processo de reparação tecidual, uma vez que vários estudos experimentais têm relatado o efeito do uso de lectinas manose-glicose na reparação de lesões cutâneas [30,31], mostrando-se eficazes como agentes terapêuticos e reduzindo o tempo de reparação tecidual. Foram avaliados efeitos sobre o reparo de lesões cutâneas em camundongos normais utilizando as isoformas 1 e 4 da lectina de *Cratylia mollis* [32] e em animais imunossuprimidos pelo emprego do Metotrexato, estudo realizado por Melo et al. [33], os quais apresentaram suas lesões eficientemente reparadas e em menor tempo.

CONCLUSÃO

A formulação em gel irradiada da Cramoll-1,4 na concentração de 300 µg mostrou-se adequada para a manutenção da atividade hemaglutinante, o que sugere sua aplicação tópica *in vivo*. A irradiação com raios gama foi eficiente no controle microbiológico da formulação. Sugere-se a continuidade de estudos, principalmente quanto aos efeitos dessa formulação *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Energia Nuclear da UFPE/FINEP e Instituto de Energia Nuclear do Rio de Janeiro.

REFERÊNCIAS

- [1] HOUGHTON, P.J. et al. *In vitro* tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 100–107, 2005.
- [2] SHARON, N.; LIS, H. A century of lectin research (1888-1988). *Trends in Biochemical Sciences*, v. 12, p. 483-487, 1987.
- [3] CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Lectins carbohydrate recognition molecules: are they toxic? In: Siddique YH, editor. *Recent trends in toxicology*. Kerala, India: Transworld Research Network, v. 37, p. 47-59, 2008.
- [4] BEUTH, J. et al. Importance of lectins for the prevention of bacterial infections and cancer metastases. *Glycoconjugate Journal*, v. 12, p. 1-6, 1995.

- [5] HONG, M. et al. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, v. 752, p. 207-216, 2001.
- [6] PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 36, p. 113-119, 1992.
- [7] CORREIA M.T.S.; COELHO L.C.B.B. Purification of a glucose/manose specific lectin, isoforma 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 55, p. 261-273, 1995.
- [8] SOUZA, G.A. et al. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. *Glycobiology*, v.13, p 961-972, 2003.
- [9] LIMA, V.L.M. et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin–cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers*, v. 33, p. 27-32, 1997.
- [10] BELTRÃO, E.I.C. et al. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 74, 125-134, 1998.
- [11] PAIVA, P.M.G. et al. Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Bioresource Technology*, v. 88, p. 75–79, 2003.
- [12] MACIEL, E.V.M. et al. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals Journal*, v. 32, p. 57–60, 2004.
- [13] ANDRADE, C.A.S. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 278, n. 2, p. 435-445, 2004.
- [14] OLIVEIRA, M.D.L. Estudo bioeletroquímico de nanosistemas híbridos de nanopartículas de ouro e lectinas para o desenvolvimento de sensores. 2008. 174 f. Tese de Doutorado – Curso de Pós-Graduação em Química – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco.
- [15] ANGELI, R. et al. Ferromagnetic Levan Composite: An AffinityMatrix to Purify Lectin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2009, p. 1-6, 2009.
- [16] YASUOKA, T. et al. The effects of lectins on indomethacin-induced small intestinal ulceration. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 84, p. 231–237, 2003.
- [17] REID, B.D.; WILSON, B.K. Radiation processing technology for cosmetics. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 42, p. 595-596, 1993.
- [18] JACOBS G.P. A review of the effect of gamma irradiation on pharmaceutical materials. *Journal of Biomaterials Applications*, v.10, p. 61-72, 1995.
- [19] BARBARIN N.; TILQUIN B.; DEHOFFMANN E. Radiosterilization of cefotaxime: investigation of potential degradation compounds by liquid chromatography electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 929, p. 51-61, 2001.

- [20] NAKI SIVRI, N. et al. Descontamination of cosmetics products and raw materials by gamma irradiation. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 31, p.189-198, 2006.
- [21] DIETZ G.R.; MAHER W.J. Radiation sterilization in the cosmetic industry update. *Cosmetics & Toiletries*, v. 97, p. 96-98, 1982.
- [22] PRADO, G. et al. Efeito da irradiação na microbiota fúngica de plantas medicinais. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 33, n. 5, p. 1372-1378, 2009.
- [23] SATOMI, L.C.; SORIANI, R.R.; PINTO, T.J.A. Descontaminação de drogas vegetais empregando irradiação gama e óxido de etileno: aspectos microbianos e químicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, n. 4, p. 445-450, 2005.
- [24] OLIVEIRA, R.S., COLAÇO, W. Radiossensibilidade gama de extrato de *Maytenus ilicifolia*: desenvolvimento de protocolo para controle de qualidade. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, n. 2, p. 235-239, 2008.
- [25] BING, D.H., WEYAND, J.G.M., STAVINSKY, A.B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 124, p. 1166-1170, 1967.
- [26] LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-75, 1951.
- [27] MAHER, W.J.; DIETZ, G.R. Radiation sterilization in the cosmetic industry. *Cosmetic & Toiletries*, v. 96, p. 53-58, 1981.
- [28] ROY, N.; SAHA, N.; HUMPOLICEK, P.; SAHA, P. Permeability and biocompatibility of novel medicated hydrogel wound dressings. *Soft Materials*, v. 8, n. 4, p. 338-357, 2010.
- [29] ROY, N.; SAHA, N.; KITANO, T.; SAHA, P. Novel hydrogels of PVP-CMC and their swelling effect on viscoelastic properties. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 117, n. 3, p. 1703-1710, 2010.
- [30] CHOI, S.; CHUNG, M. A review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine*, v.1, n.1 p. 53-62, 2003.
- [31] LOPES, G.C. et al. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, n. 2, p. 265–272, 2005.
- [32] MELO, C.M.L. et al. Topical use of *Cratylia mollis* lectin in wound healing in mice. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, XXX SBBq Anais*, p. 112, 2003.
- [33] MELO, C.M.L. et al. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 408, p. 113–119, 2011b.

Radiomarcção da Cramoll-1,4: Avaliação da biodistribuição

Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio¹, María Helena Madruga Lima-Ribeiro², Maria Tereza dos Santos Correia³, Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão³, Marta de Souza Albernaz¹, Thiago Barboza¹, Sergio Augusto Lopes de Souza⁴, Ralph Santos-Oliveira^{1*}

¹Laboratory of Nanoradiopharmaceuticals, Academical Hospital Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro, Brazil;

²Federal Rural University of Pernambuco, Department of Morphological and Biochemical Analysis, Recife, Brazil;

³Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;

⁴Department of Radiology - University Hospital Clementino Fraga Filho - Laboratory of Cell and Molecular Marking - Federal University of Rio de Janeiro - RJ - Brazil.

*Correspondent author: Dr Ralph Santos-Oliveira, Laboratory of Nanoradiopharmaceuticals.
E-mail: roliveira@ien.gov.br

RESUMO

A Cramoll-1,4 é uma lectina bem estudada. Entretanto, poucas pesquisas foram feitas sobre a sua biodistribuição. Neste estudo foram analisadas a radiomarcção e a biodistribuição da Cramoll-1,4 com Tc-99m. Os resultados mostraram que a Cramoll-1,4 é captada no intestino, metabolizada pelo fígado e excretada pelos rins e ainda que esta lectina não ultrapassa a barreira hematoencefálica e que a técnica nuclear pode ser útil para o desenvolvimento de drogas e biofármacos.

Palavras-chave: Lectinas; cintilografia; farmacologia; radiofarmácia.

ABSTRACT

The Cramoll-1,4 lectin is a well studied. However, little research has been done on its biodistribution. This study analyzed the radiolabeling and biodistribution of Cramoll-1,4 with Tc-99m. The results showed that Cramoll-1,4 is captured in the intestine, metabolized by the liver and excreted by the kidneys and that this lectin does not cross the blood brain barrier and that nuclear technology can be useful for the development of drugs and biopharmaceuticals.

Keywords: Lectins; scintigraphy; pharmacology; radiopharmacy.

INTRODUÇÃO

Camaratu ou feijão Camaratura (*Cratylia mollis*) é uma leguminosa da região semi-árida do Nordeste do Brasil. Lectinas são proteínas frequentemente encontradas em superfícies celulares ou em partículas intracelulares [1]. Possuem sítios de ligação específicos para carboidratos e têm a capacidade de interagir com moléculas de fluidos biológicos presentes em superfícies celulares [2]. Lectinas pode substituir ligações naturais e ativar respostas celulares através de diferentes caminhos de sinalização intracelular ou endocitose de compostos formados [3, 4]. O uso terapêutico das lectinas no processo de reparo de feridas cutâneas é ainda pouco estudado.

Formas moleculares da lectina de sementes *C. mollis* (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4) têm sido altamente purificadas e caracterizadas [2, 5]. Cramoll 1, Cramoll 2 e Cramoll 4 ligam especificamente glicose/manose, enquanto Cramoll 3 é uma glicoproteína galactose-específica. Preparações contendo as isoformas (Cramoll-1,4) e isolectinas (Cramoll 1,2,3), bem como Cramoll 1, foram estudadas em análises estruturais e para as mais diversas aplicações biotecnológicas [6, 12].

Desde a descoberta do elemento Tecnécio, em 1947, tem sido usado para muitas finalidades. Entre os vários usos, o processo de marcação para as moléculas é a mais bem estabelecido. Cintilografia fornece um método de imagem tridimensional para localizar exatamente emissores gama em um procedimento não invasivo *in vivo*. Para a caracterização de drogas e biomoléculas, técnicas de imagem molecular são extremamente úteis para seguir a biodistribuição em estudos experimentais em animais [13]. Neste estudo, as isolectinas de Cramoll-1,4 foram marcadas com Tc-99m para a avaliação da biodistribuição.

METODOLOGIA

Cromatografia

Os processos de marcação foram feitos usando 150 µL de solução de Cramoll (isoforma 1,4) incubados com solução de cloreto de estanho (SnCl_2) (80 µL/mL) (Sigma-Aldrich) por 20 minutos em temperatura ambiente. Esta solução foi

incubada com 100 μCi (aproximadamente 300 μL) de tecnécio-99m (IPEN/CNEN) por 10 minutos, a fim de marcar a Cramoll-1,4 (aqui chamada apenas de cramol) com Tc-99m.

A fim de caracterizar a marcação da cramol, cromatografia em camada fina (TLC) foi feita utilizando papel Whatman n^o. 1. A TLC foi realizada usando 2 μL de uma amostra utilizando-se a acetona (Proquimios) como fase móvel. A radioatividade das tiras foi verificada em um contador gama (Packard, Cobra II), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Cromatografia crescente de Tc^{99m}-cramol, comparação com percentual livre (Na^{99m}TcO₄).

	Solvente	Inferior (%)	Superior (%)
Tc ^{99m} -cramol	Acetona	89.4	10.6
Na ^{99m} TcO ₄	Acetona	0.3	99.7

Biodistribuição

A biodistribuição foi feita usando rato *Wistar* macho. Neste sentido, o Conselho de Revisão Institucional e o Comitê de Ética Animal aprovaram o protocolo experimental para esse estudo. As amostras marcadas (3,7 MBq/0,2 mL) foram administradas após o cateterismo da veia jugular. Imagens planares foram obtidas uma hora após a injeção em uma Câmara Gamma Millennium (GE Healthcare, Cleveland, EUA). Foram obtidas contagens por 5min em uma janela de 15% centrada em 140 KeV (Figura 1), podendo ser observados fígado (seta fina), rim (cabeça de seta) e bexiga (seta grossa).

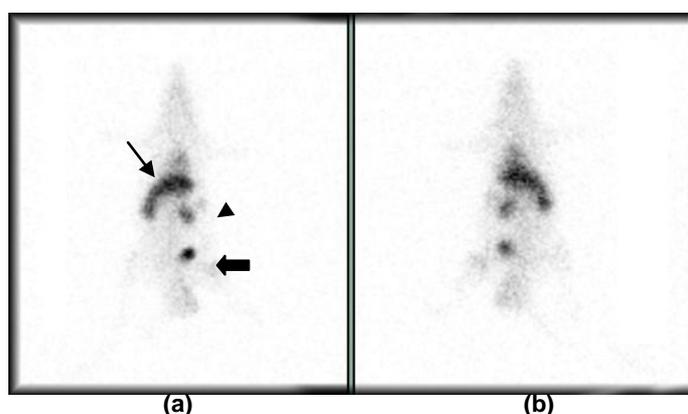


Figura 1. Biodistribuição da Cramol em rato. (a) vista anterior; (b) vista posterior.

Após a eutanásia, alguns órgãos foram removidos e pesados e a captação foi contada em um contador gama (Packard-Cobra II). Resultados foram expressos como a porcentagem de dose injetada por órgão e por grama de tecido (Tabela 2).

Tabela 2: Biodistribuição das amostras marcadas em rato.

Órgãos	% dose/órgão	% grama/tecido
Coração	2,98	1,78
Pulmão direito	2,65	2,93
Pulmão esquerdo	3,58	2,88
Fígado	50,82	4,17
Baço	4,28	3,69
Estômago	1,44	0,38
Intestino	15,38	23,30
Rim direito	14,83	8,23
Rim esquerdo	3,77	2,35
Sangue	0,27	0,27

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cromatografia

Nesse caso, os resultados (Tabela 1) mostraram que a acetona pode ser usada para esta finalidade. Em um teste triplicado, todos os resultados foram muito próximos. O percentual livre foi eluído ao topo dos cromatogramas e a cramol ficou no fundo. Além disso, os resultados observados no cromatograma elucidaram a questão sobre a eficácia do processo de marcação, corroborando que a cramol foi eficientemente marcada com Tc-99m.

Estudos de Biodistribuição

Como foi observado na Figura 2 a cintilografia do Tc^{99m}-Cramol 1 h após a injeção mostra fígado, rins e bexiga. A: vista anterior. B: vista posterior.

Como pode ser visto grande parte da lectina foi processada pelo fígado. Isso é absolutamente normal, especialmente em drogas injetáveis, já que quase todas as drogas são metabolizadas pelo sistema hepático. A Tabela 2 mostra um acúmulo da lectina no intestino, o que é perfeitamente normal para a captação de uma proteína na imensa malha que representam as microvilosidades intestinais. Na

Figura 1 é possível observar que a excreção é realizada pelos rins e não ultrapassa a barreira hematoencefálica. E, neste caso, a lectina não representa um risco para a função cerebral.

CONCLUSÃO

A radiomarcagem da Cramoll mostrou que a Cramoll-1,4 é absorvida pelo intestino, processada pelo fígado e excretada pelos rins e não ultrapassa a barreira hematoencefálica. Ela também mostrou que a técnica nuclear pode ser muito útil para o desenvolvimento de drogas e medicamentos.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi apoiada pela FAPERJ, CNPq e UFPE.

REFERÊNCIAS

- [1] N. Sharon and H. Lis, "A century of lectin research (1888–1988)," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 12, pp. 488–491, 1985.
- [2] M.T.S. Correia and L.C.B.B. Coelho, "Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean)," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 55, no. 3, pp. 261–273, 1995.
- [3] M. Hong, A. Cassely, Y. Mechref, and M.V. Novotny, "Sugarlectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis," *Journal of Chromatography*, vol. 752, no. 2, pp. 207–216, 2001.
- [4] J. Beuth, H.L. Ko, G. Pulverer, G. Uhlenbruck, and H. Pichlmaier, "Importance of lectins for the prevention of bacterial infections and cancer metastases," *Glycoconjugate Journal*, vol. 12, no. 1, pp. 1–6, 1995.
- [5] P.M.G. Paiva and L.C.B.B. Coelho, "Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (camaratu bean)," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 36, no. 2, pp. 113–118, 1992.
- [6] R. Angeli, N.V. da Paz, J.C. Maciel et al., "Ferromagnetic levan composite: an affinity matrix to purify lectin," *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, vol. 2009, Article ID 179106, 2009.
- [7] M.D.L. de Oliveira, "Estudo bioeletroquímico de nanosistemas híbridos de nanopartículas de ouro e lectinas para o desenvolvimento de sensores," 174 f. tese

de doutorado—curso de pós-graduação em química—centro de ciências exatas e da natureza, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

[8] C.A.S. Andrade, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, S.C. Nascimento, and N.S. Santos-Magalhães, “Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 278, no. 2, pp. 435–445, 2004.

[9] E.V.M. Maciel, V.S. Araújo-Filho, M. Nakazawa, Y.M. Gomes, L.C.B.B. Coelho, and M.T.S. Correia, “Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes,” *Biologicals*, vol. 32, no. 1, pp. 57–60, 2004.

[10] P.M.G. Paiva, A.F. Souza, M.L.V. Oliva et al., “Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins,” *Bioresource Technology*, vol. 88, no. 1, pp. 75–79, 2003.

[11] E.I. Beltrão, M.T. Correia, J. Figueiredo–Silva, and L.C. Coelho, “Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to mamary human tissues,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 74, pp. 125–134, 1998.

[12] V.L.M. Lima, M.T.S. Correia, Y.M.N. Cechinel, C.A.M. Sampaio, J.S. Owen, and L.C.B.B. Coelho, “Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin–cholesterol acyltransferase,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 33, pp. 27–32, 1997.

[13] O.M. Merkel, D. Librizzi, A. Pfestroff, T. Schurrat, M. Béhé, and T. Kissel, “*In vivo* spect and real-time gamma camera imaging of biodistribution and pharmacokinetics of siRNA delivery using an optimized radiolabeling and purification procedure,” *Bioconjugate Chemistry*, vol. 20, no. 1, pp. 174–182, 2009.

Avaliação da eficácia da formulação em gel irradiado da lectina de sementes de *Cratylia mollis* no processo de reparo ósseo em ratas

Maria Helena Madruga Lima-Ribeiro^{I,II} Ralph Santos-Oliveira^{III*} Adriana Ferreira Cruz^{IV} Mauricélia Firmino de Santana^V Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti^I Nicodemos Teles de Pontes Filho^I Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^{VI} Maria Tereza dos Santos Correia^{VI} Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão^{II,VII}

^ILaboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil.

^{II}Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (UFRPE), Recife-PE, Brasil.

^{III}Instituto de Energia Nuclear (IEN), Divisão de Radiofarmácia, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^{IV}Núcleo de Cirurgia Experimental (NUCE), Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

^VPrograma de Pós- Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

^{VI}Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

^{VII}Departamento Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Autor para Correspondência: Endereço: Rua Hélio de Almeida, 75, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil. CEP. 21941-906. E-mail:roliveira@ien.gov.br

RESUMO

A regeneração corresponde à substituição das células lesadas por outras que apresentem a mesma morfologia e função. Para avaliação experimental de materiais que venham a favorecer o processo de reparo ósseo, são criados defeitos com dimensões que impeçam a regeneração espontânea. Para o desenvolvimento e emprego de novos fármacos se faz necessário o estudo sobre seus efeitos *in vitro*, que depende da formulação, concentração e dose de irradiação e *in vivo* da via e frequência de administração, desta forma é possível caracterizar os mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na resposta e efeitos celulares. Neste sentido o objetivo deste estudo foi aplicar uma formulação biofarmacêutica da lectina de Cramoll-1,4 na concentração de 300 µg/100 µL em aplicação única sob radiação gama e avaliar o seu efeito sobre o processo de reparo ósseo em ratas. Histologicamente foi observado que o defeito ósseo apresentava-se revestido por tecido conjuntivo frouxo, rico em fibroblastos, constituindo uma faixa com espessura semelhante ao tecido ósseo original, competindo com sítio de neoformação óssea, impedindo o contato direto entre a formulação experimental e o tecido ósseo, sendo possível concluir que a apesar da sua eficácia comprovada em experimentos sobre reparo de lesões de pele, podemos afirmar que, no que diz respeito à formulação empregada não promoveu estimulação óssea, que favorecesse o processo de reparação tecidual, uma vez

que houve interferência direta do reparo do tecido conjuntivo frouxo, impedindo o contato direto do material implantado com a interface óssea.

Palavras-chave: Produtos naturais; gel irradiado; Cramoll-1,4; reparo ósseo.

ABSTRACT

Regeneration corresponds to the replacement of damaged cells with ones that have the same morphology and function. For experimental evaluation of materials that may favor the process of bone healing, defects are created with dimensions that prevent spontaneous regeneration. For the development and use of new drugs is necessary to study its effects *in vitro*, which depends on the formulation, concentration and rate of irradiation *in vivo* and the route and frequency of administration, thus it is possible to characterize the physiological and molecular mechanisms involved in the response and cellular effects. In this sense the objective of this study was to apply a formulation of biopharmaceutical lectin Cramoll-1,4 at a concentration of 300 µg/100 µL in a single application in gamma radiation and to assess its effect on the process of bone repair in rats. Histologically it was observed that the bone defect is coated by loose connective tissue rich in fibroblasts, providing a range similar to the thick bone original, competing with site of new bone formation, preventing direct contact between the formulation and experimental bone tissue, as can be concluded that despite its proven effectiveness in experiments on the repair of skin lesions, we can say that, with regard to the formulation used did not promote bone stimulation, which would promotes the tissue repair process, since there was direct interference of loose tissue repair, preventing direct contact of the implant with the bone interface.

Keywords: Natural products; irradiated gel; Cramoll-1,4; bone repair.

INTRODUÇÃO

Atualmente a traumatologia vem procurando novos métodos para uma reparação óssea mais eficiente. Neste sentido, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas objetivando melhorar o processo de reparo ósseo, estudos estes

que envolvem não apenas técnica cirúrgica, mas também a utilização de recursos biológicos e moleculares (BARROS, 2006).

O reparo ósseo envolve uma complexa cascata de respostas biológicas, sendo afetada por fatores locais e externos e regulado pela interação de diferentes mecanismos. Estando o aumento ou decréscimo da capacidade de reparação óssea diretamente relacionada a alterações ocorridas na remodelação (AMADEI et al., 2006).

A regeneração óssea é entendida como sendo a substituição das células lesadas por outras idênticas morfológica e funcionalmente. No osso, lesões com dimensões pequenas são reparadas com facilidade, sem deixar cicatriz fibrosa, uma vez que uma característica peculiar desse tipo de tecido é dispor de um mecanismo reparador semelhante ao da osteogênese embriológica (SEAL et al., 2001). Entretanto a capacidade regenerativa do tecido ósseo é limitada pela extensão da lesão, neste sentido defeitos ósseos extensos ocasionados por trauma, tumores, infecções e anomalias de desenvolvimento, não se regeneram espontaneamente, representando um desafio para a comunidade científica (MENDONÇA, 2004).

Segundo SCHIMITZ & HOLLINGER (1986) em todo estudo experimental, deve ser estabelecido um defeito de tamanho crítico (CSD – Critical Size Defect), que é definido como o menor defeito intraósseo que não cicatrizará espontaneamente por toda a vida do animal, ocorrendo a formação de tecido conjuntivo fibroso e não formação óssea. De acordo com SEO et al. (2008) são considerados defeitos críticos em roedores experimentais lesões com diâmetro maior do que 2,7 mm.

Lectinas representam um grupo de proteínas estruturalmente heterogêneo, glicosiladas ou não, de origem não imune que possuem a capacidade de reconhecer pelo menos um sítio de ligação reversível a monossacarídeos ou oligossacarídeos específicos (LIS & SHARON, 1990). As superfícies celulares são ricas em glicoproteínas (receptores glicosídicos) que potencialmente interagem com as lectinas através da porção glicídica; esta interação lectina-célula é a base molecular que pode desencadear várias alterações biológicas nos organismos (ISIDRO et al., 2001).

Quanto ao uso de lectinas glicose-manose no processo de cicatrização, as lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea* (SCHIRATO et al., 2004),

Cratylia mollis e *Canavalia ensiformis* (ALBUQUERQUE et al., 2006) tem sido utilizadas em esquemas de tratamento tópico mostrando-se eficazes como agentes terapêuticos.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da utilização da formulação em gel irradiado da lectina de *Cratylia mollis* (isoformas 1 e 4) em defeitos ósseos induzidos experimentalmente em ratas, considerando-se a redução do tempo de reparo tecidual e as características histológicas do processo de reparo em relação ao tratamento experimental aplicado, avaliação da bioquímica sérica e dosagem mineral óssea.

METODOLOGIA

Formulação em Gel Irradiado da Cramoll-1,4

O Carbopol® foi usado como veículo, suspenso em tampão de ácido bórico (pH 6,0) a 25° C. Após extração e purificação, soluções de Cramoll-1,4 foram adicionadas em quantidade necessária para atingir a concentração final de 300 µg em 100 µL de gel. A irradiação foi realizada em temperatura ambiente usando Cobalto-60 na dose de 15 kGy (LIMA-RIBEIRO et al., 2010).

Seleção e Tamanho da Amostra

Todos os procedimentos relacionados ao uso de animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo N°. 016036/2007-10).

Foram utilizados 12 ratos (*Rattus norvegicus*) albinos, fêmeas da linhagem *Wistar*, a partir dos 90 dias de idade, pesando em média 300 ± 50 g, sendo produzidos dois defeitos críticos em cada animal, aonde cada animal era controle de si mesmo e para cada período experimental (15, 30, 45 e 60 dias de pós-operatório) foram submetidos à eutanásia três animais.

Indução do Defeito Crítico

Os animais foram pré-anestesiados com sulfato de atropina na dose de 0,04 mg/kg/IM. Após dez minutos foi empregada uma associação anestésica do Cloridrato de quetamina 10% (90 mg/kg) e do Cloridrato de xilazina 2% (10mg/kg),

por via intramuscular. Foi realizada a tricotomia da calvária do rato e a anti-sepsia com solução alcoólica de polivilpirrolidona iodo 10%, seguida de anestesia local com bupivacaína 2.000 UI e secção da pele e tecido subcutâneo. Foram produzidas duas cavidades ósseas circulares (em cada região parietal), utilizando-se uma broca de trefina com cinco mm de diâmetro (Figura 1).



Figura 1: Indução do defeito crítico. Produção de duas cavidades ósseas circulares (em região parietal) medindo 5 mm de diâmetro.

Uma das cavidades foi preenchida com o tratamento experimental, enquanto que a outra foi preenchida com gel excipiente como controle. Posteriormente, as duas cavidades foram cobertas por uma membrana de celulose reabsorvível (Bionext[®]), para que não ocorresse a passagem do material de uma cavidade para a outra. Os planos superficiais foram suturados.

No pós-operatório imediato, os animais foram mantidos em ambiente sem ar condicionado e submetidos a aquecimento através de uma fonte de luz, evitando-se hipotermia, depressão cárdio-respiratória e óbito, tomando-se o cuidado de proteger os olhos com uma gaze umedecida em solução fisiologia (NaCl 0,9%) (Figura 2).



Figura 2: Cuidados pós-operatórios. Animais mantidos em ambiente sem ar condicionado e submetidos a aquecimento através de uma fonte de luz.

Também foi instituída analgesia imediatamente após o término da cirurgia através da administração de Dipirona sódica (0,15 mg/kg) por via intramuscular e manutenção por mais três dias consecutivos, adicionada à água de beber (40 mg/kg).

Não foi realizada a administração de antibiótico uma vez que foram adotadas medidas profiláticas de controle de ambiente em sala de cirurgia asséptica, uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) estéreis e adequados ao procedimento cirúrgico e anti-sepsia da área a ser operada. Os animais foram acompanhados diariamente quanto a sinais de dor (pelos eriçados e anorexia), alterações de comportamento (apatia e sonolência) ou alterações neurológicas (deambulação e desvio de cabeça) que poderiam evidenciar algum dano neurológico e/ou infeccioso. Apesar de ser uma cirurgia invasiva, os animais apresentaram comportamento normal da espécie e ingestão de alimento e água.

Eutanásia e Coleta de Amostras

Nos períodos pré-estabelecidos a partir das 8:00h, com jejum alimentar de duas horas os animais foram anestesiados, sendo coletados 4 mL de sangue de cada animal por punção cardíaca em tubos de ensaio estéreis. Em seguida foi administrada dose excessiva de Tiopental sódico, por via intraperitoneal, para conclusão da eutanásia.

Bioquímica Sérica

Cálcio, Fósforo e Magnésio

A determinação dos níveis de cálcio foi realizada pelo Método Arzenazo III Diasys, a determinação do fósforo através do Método Mobilidato UV Diasys e a determinação do magnésio através do Método de Xilidil Diasys.

Albumina e Fosfatase alcalina

Foram realizadas pelo Método de Automação Architect em soro sanguíneo.

Dosagem Mineral Óssea - Proporção de Ca, P e Mg

Foram reservadas as tíbias esquerdas de cada animal, depositadas individualmente em cadinhos de porcelana em estufa a uma temperatura de 100 °C durante duas horas. A metodologia empregada foi a Espectrofotometria de Absorção Atômica (MODELO SHIMADZU AA-6.300).

Obtenção e Processamento de Material para Análise Histológica do Reparo Ósseo

A calota craniana foi retirada, imersa em solução de formaldeído 10% em PBS (solução salina isotônica, tamponada com fosfato de sódio), pH 7.2-7.4 por, no mínimo, 24 horas. Após a fixação, as calotas foram descalcificadas em solução de ácido nítrico 10% durante 2 horas à temperatura de 60° C. Em seguida, foram lavadas em água destilada, desidratadas em bateria crescente de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. As amostras foram seccionadas em cortes semiseriados de 5µm de espessura e coradas por Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM).

Estatística

A análise estatística consistiu na comparação dos níveis médios de albumina, fosfatase alcalina, cálcio, potássio e magnésio segundo os diferentes períodos experimentais, utilizando o teste t de *Student* para amostras independentes, adotando significância estatística de 5% (p-valor < 0,05). O software utilizado para análise de dados foi o STATA na versão 9.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir (Figura 3) foram realizadas as Médias \pm Desvio Padrão das dosagens séricas de Albumina (ALB.), Fosfatase Alcalina (F.A.), Cálcio (Ca⁺), Fósforo (P) e Magnésio (Mg) nos períodos experimentais.

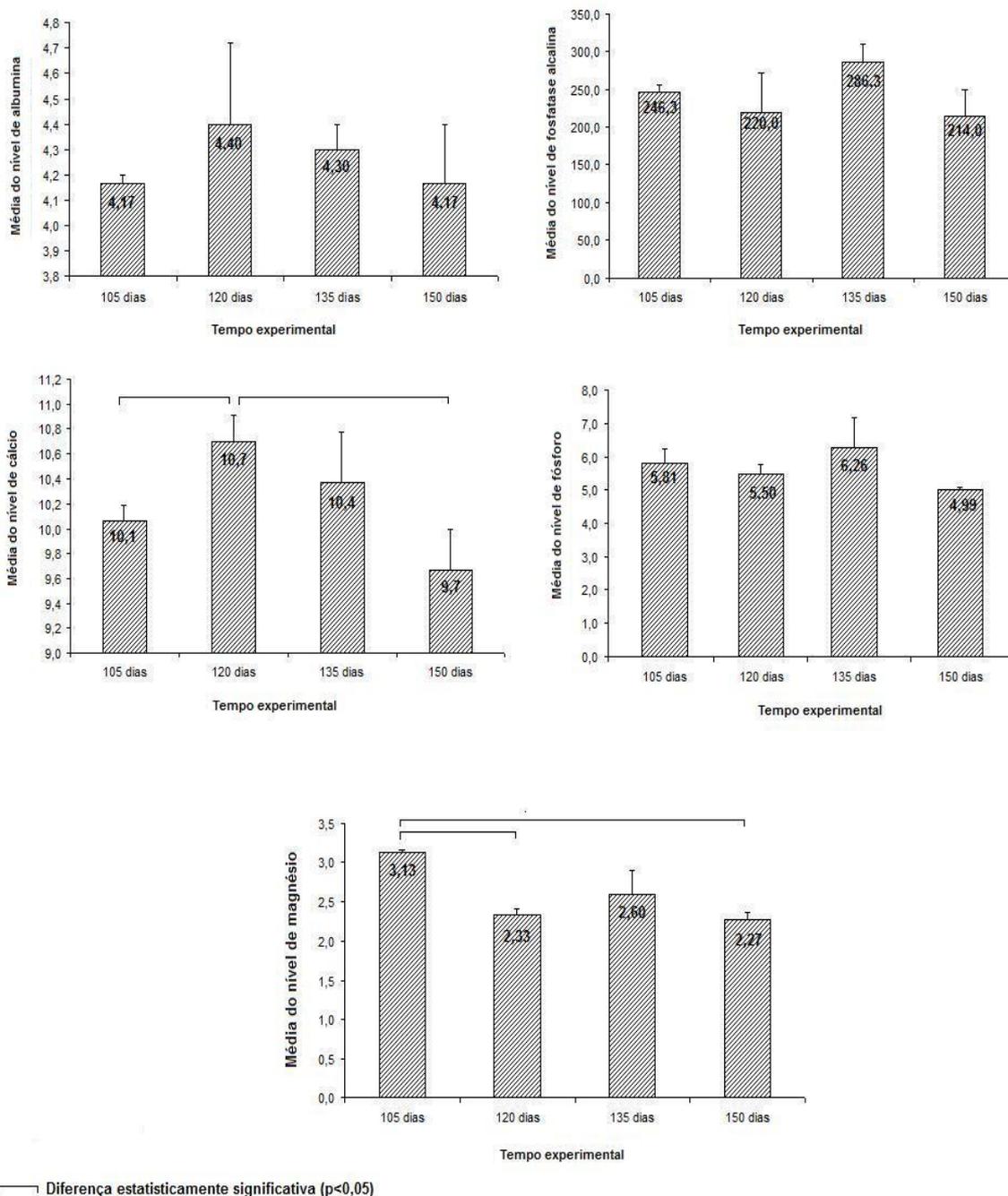


Figura 3. Níveis médios séricos de albumina, fosfatase alcalina, cálcio, fósforo e magnésio segundo os diferentes períodos experimentais.

Os valores séricos encontrados (Figura 3) estão dentro dos limites estabelecidos por MITRUKA & RAWNSLEY (1977), apresentando uma diferença relacionada aos valores da fosfatase alcalina (56,8 – 128 U/L), enquanto que em todo período experimental a dosagem da fosfatase alcalina foi bastante elevada (214,0 – 286,0 U/L).

Os níveis de fosfatase alcalina (Figura 3) não se mostraram diferentes quando comparados os períodos experimentais. Em média o grupo com 135 dias (45 dias de pós-operatório) teve o maior nível de fosfatase alcalina. Entretanto, esse nível sempre esteve acima do que foi estabelecido pela BASELINE HEMATOLOGY AND CLINICAL CHEMISTRY VALUES FOR CHARLES RIVER WISTAR RATS para fêmeas entre 19 – 21 semanas de idade (1993) (39 – 177 U/L) e (39 – 216 U/L) estabelecido por OLFERT et al. (1993) o que pode ser justificado pelo fato das coletas terem sido realizadas após 105 dias (15 dias de dias de pós-operatório), o que coincide com a fase de produção da matriz colágena havendo uma maior produção de fosfatase alcalina (STEIN & LIAN, 1993).

Analisando as medidas de albumina (Figura 3) nos quatro períodos experimentais, observa-se que há um aumento na média no grupo de animais sacrificados aos 120 dias (30 dias de pós-operatório) quando comparados aos outros grupos, porém a diferença não foi estatisticamente significativa. A média de albumina em todos os períodos experimentais variou entre 4,1 e 4,4 g/dL, com grande variabilidade no grupo com 30 dias de experimentação.

No que se refere ao nível de cálcio (Figura 3), aos 120 dias (30 dias de pós-operatório) teve média de 10,7 mg/dL de cálcio, sendo a diferença estatisticamente significativa quando comparados aos grupos com 105 dias (15 dias de pós-operatório) ($p = 0,050$) e 60 dias de experimento ($p = 0,048$). Avaliando o comportamento, houve um aumento significativo do cálcio aos 120 dias (30 dias pós-operatório), diminuindo a concentração aos 150 dias (60 dias de pós-operatório).

Apesar da variação encontrada, os níveis de cálcio foram mantidos dentro dos valores de referência estabelecidos por MITRUKA & RAWNSLEY (1977) (7,2-13 mg/dL) o que segundo TAKADA et al. (1997); SWENSON & REECE (1993) e NORDIN (1997) é esperado, uma vez que a concentração sérica de cálcio se mantém constante e somente em circunstâncias extremas como desnutrição ou hiperparatireoidismo, a concentração sérica desse mineral na sua forma ionizada sofre alterações.

De acordo com COHEN & ROE (2000) 80% do cálcio plasmático são encontrados ligados à albumina. Neste sentido o total de cálcio deve ser sempre interpretado juntamente com as concentrações de albumina. O que pode ser

facilmente observado na Figura 3, quando relacionamos as alterações nos níveis de cálcio e albumina nos períodos experimentais.

Em relação ao fósforo (Figura 3) os níveis não variaram entre diferentes tempos de acompanhamento, tendo em média uma concentração entre 5 e 6 mg/dL em todos os grupos experimentais, estando dentro dos parâmetros estabelecidos como normais (5,3-8,3 mg/dL) por NICHOLS (2003), apresentando a proporção de 2:1 de cálcio e fósforo, adequada à espécie em estudo permitindo uma boa absorção do cálcio a nível intestinal e manutenção do equilíbrio homeostático (SWENSON & REECE, 1993).

Os níveis médios de concentração de magnésio (Figura 3) reduziram quando avaliados os grupos com maior tempo após a intervenção. Observa-se que aos 105 dias (15 primeiros dias após a indução do defeito crítico), em média a concentração de magnésio foi de 3,1 mg/dL, reduzindo significativamente ($p = 0,001$) quando comparado ao grupo com 120 dias (30 dias de pós-operatório). Aos 150 dias (60 dias de pós-operatório) os níveis de magnésio foram estatisticamente menores quando comparados ao momento inicial. Entretanto, os níveis encontrados durante o período experimental estavam acima dos níveis considerados normais por NICHOLS (2003) (1,6 mg/dL) e dentro dos valores estabelecidos por BAUCK & BIHUM (1997) (2,6 – 3,11 mg/dL).

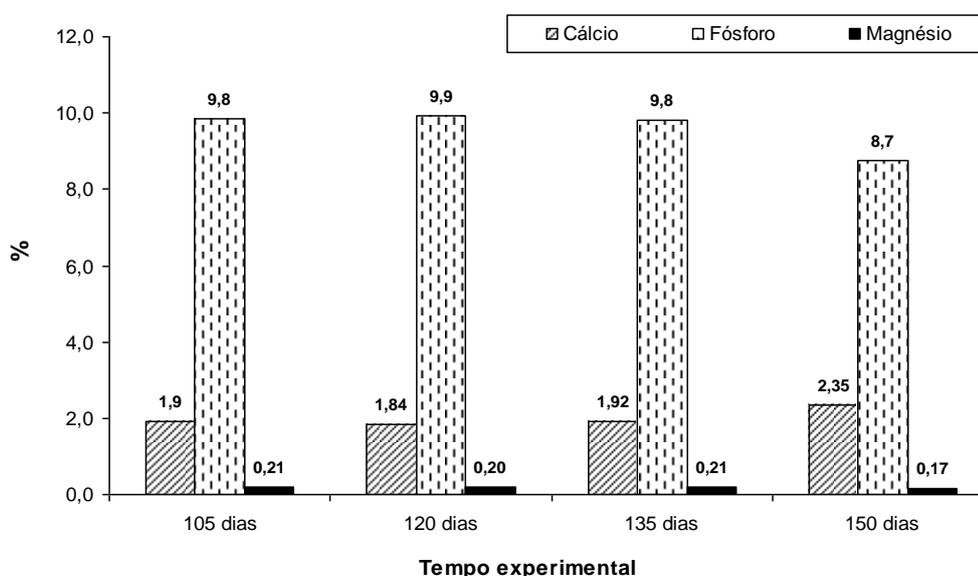


Figura 4. Dosagem mineral óssea percentual de cálcio, fósforo e magnésio segundo os diferentes períodos experimentais.

No que diz respeito à relação entre a dosagem mineral óssea e o tempo de experimentação (Figura 4) esta não se modifica em nenhum dos parâmetros, permanecendo por todo período experimental entre 1,9 – 2,35% de cálcio, 8,7 – 9,8% de fósforo e 0,17 – 0,21% de magnésio.

Analisando a Figura 4, observa-se que a relação da dosagem mineral óssea com o tempo de experimentação não se modifica em nenhum dos parâmetros, permanecendo por todo período experimental entre 1,9 – 2,35% de cálcio, 8,7 – 9,8% de fósforo e 0,17 – 0,21% de magnésio.

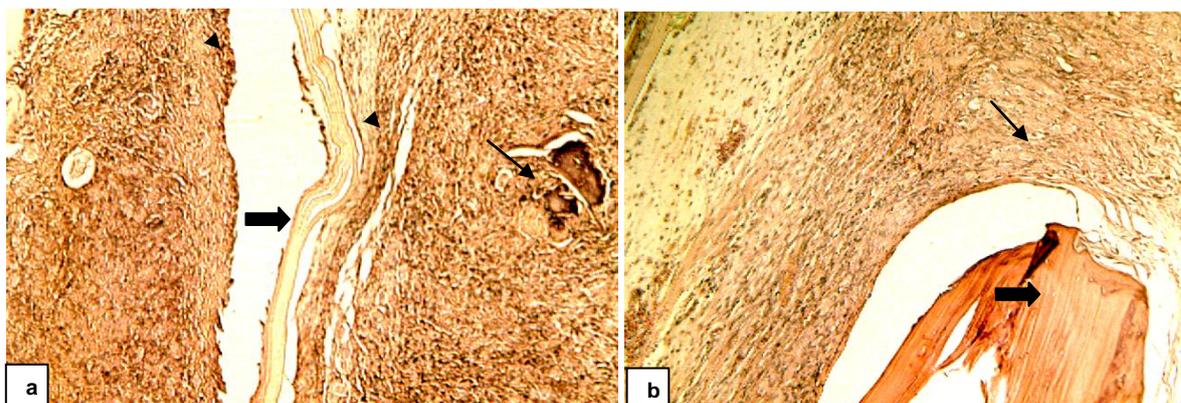


Figura 5 - Micrografia de tecido conjuntivo ósseo de ratas, submetidas à indução de defeito crítico em osso parietal. Coloração Hematoxilina-Eosina. Aumento 100×. **a** – Animal do grupo controle aos 105 dias (15 dias de pós-operatório), com presença de infiltrado inflamatório em tecido conjuntivo frouxo (cabeça de seta), área de necrose (seta) e visualização da membrana de celulose (seta grossa). **b** – Animal do grupo tratado aos 120 dias (30 dias de pós-operatório) apresentando tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos (seta) e osteócitos (seta grossa), sem alteração na celularidade óssea. Evidenciando o completo afastamento promovido pelo tecido conjuntivo frouxo “sequestrando” o material implantado impedindo o contato direto do material com a interface óssea.

Na Figura 5 podem ser observadas micrografias de lâminas coradas pela Hematoxilina-Eosina de animais do grupo controle (Figura 5a) aos 105 dias (15 dias de pós-operatório) e tratado (Figura 5b) aos 120 dias (30 dias de pós-operatório) apresentando tecido conjuntivo frouxo com infiltrado inflamatório agudo, presença de fibroblastos e tecido ósseo com osteócitos, sem alteração na celularidade. Também foi evidenciado o completo afastamento promovido pelo tecido conjuntivo frouxo (Figura 5a,b) que “sequestrou” o material implantado, impedindo o contato direto do material com a interface óssea e consequentemente dificultando o estímulo que poderia ser promovido pela ação da lectina a alterações na celularidade. Uma vez que o emprego de proteínas que se ligam a resíduos de carboidratos foi proposto para o desenvolvimento e modulação de eventos como comunicação, diferenciação e proliferação celular (MOREIRA et al., 1991; CAVADA et al., 1998; GABIUS & GABIUS, 2002).

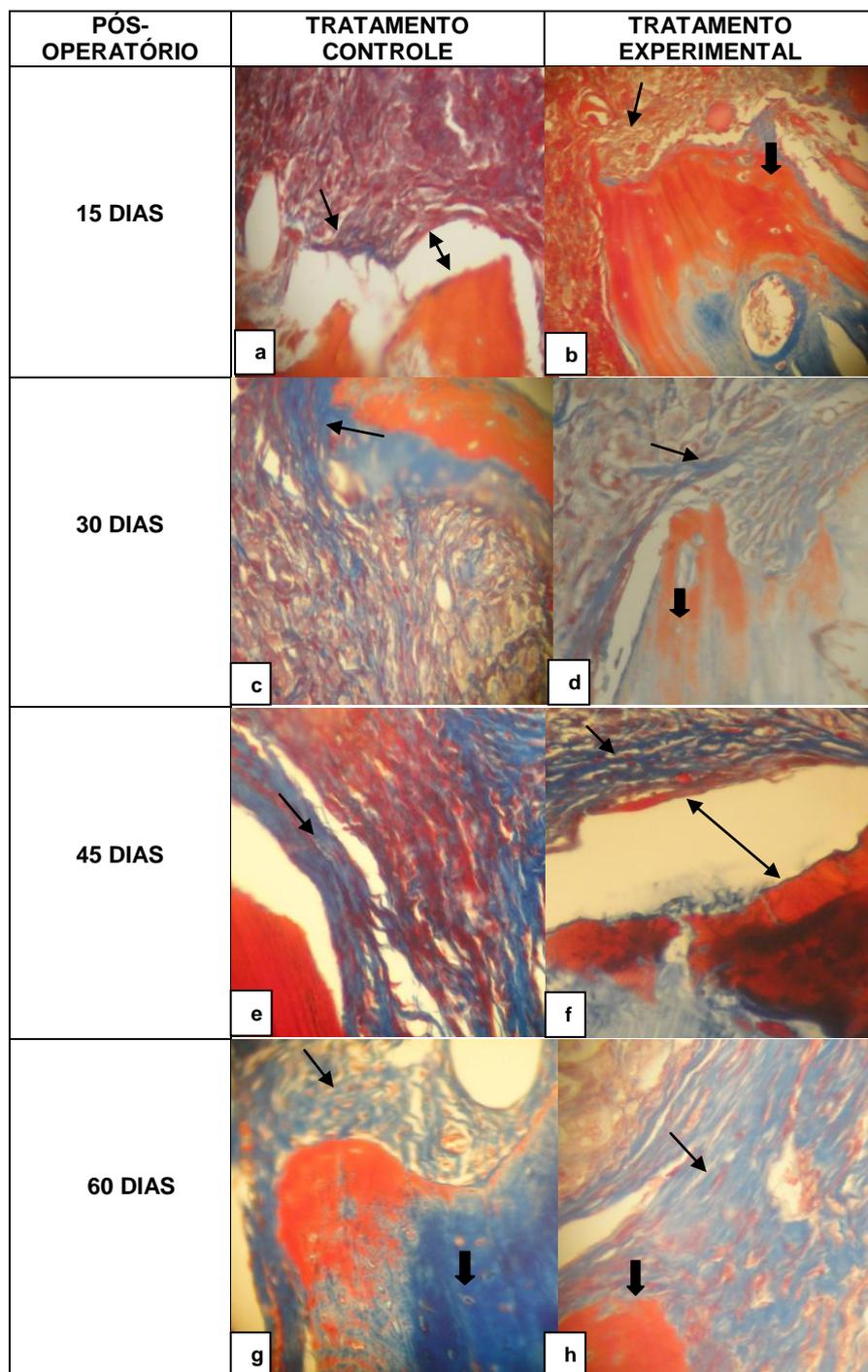


Figura 7 – Micrografia de tecido conjuntivo ósseo de ratas, submetidas à indução de defeito crítico em osso parietal. Coloração Tricrômico de Masson. Aumento 200x. **a – GC** aos 15 dias de pós-operatório, com colágeno frouxo, disperso no infiltrado inflamatório (seta), tecido conjuntivo frouxo afastando o material do tecido ósseo (seta dupla). **b – GT** aos 15 dias de pós-operatório, apresentando colágeno frouxo, disperso no infiltrado inflamatório, incorporado ao gel (seta fina) e presença de osteócito (seta grossa). **c – GC** aos 30 dias, apresentando fibras colágenas mais densas (seta). **d – GT** aos 30 dias, presença de necrose focal (seta) e fibras colágenas mais densas (seta grossa). **e – GC** aos 45 dias, apresentando colágeno denso (seta) e ausência de infiltrado inflamatório. **f – GT** aos 45 dias, ausência de infiltrado inflamatório, presença de fibras colágenas densas (seta) e evidência do completo afastamento do tecido conjuntivo frouxo, com o material implantado do tecido ósseo (seta dupla). **g – GC** aos 60 dias com presença de fibroblastos, sem reparo ósseo (seta) presença de osteócitos (seta grossa). **h – GT** aos 60 com presença de fibroblastos intensa (seta), sem reparação tecidual (seta grossa) evidenciando a borda do defeito ósseo induzido.

Na Figura 6 podem ser observadas micrografias de lâminas coradas pelo Tricrômico de Masson aos 60 dias de pós-operatório que tanto do grupo controle como do grupo experimental os defeitos ósseos mostraram-se revestidos por tecido conjuntivo denso, rico em fibroblastos, competindo com sítio de neoformação óssea, impedindo o contato direto entre a formulação experimental e o tecido ósseo. O que representa situação semelhante à encontrada em um dos grupos experimentais estudados por ALMEIDA et al. (2010), trabalhando com polímero de mamona. Segundo ALMEIDA et al. (2000) a interposição de células não osteogênicas na área do defeito cirúrgico impede a migração de células com potencial osteogênico, interferindo diretamente no processo de reparo ósseo.

O princípio da regeneração óssea é que o processo de reparo ósseo ocorre através da competição entre as células ósseas e do tecido conjuntivo visando à colonização e preenchimento do defeito crítico, o que representa um dos princípios da engenharia tecidual (BUSER et al., 1993; PECORA et al., 1997; WIKESJÖ e SELVIG, 1999).

Segundo MONTEIRO et al. (2010) em estudo empregando Plasma Rico em Plaquetas em formulação em gel, no tratamento de falhas em osso parietal de camundongos aos 90 dias de pós-operatório os defeitos (ϕ 6 mm) não estavam completamente preenchidos e que mesmo com o incremento no processo de reparação óssea este não foi suficiente para reparação total do defeito.

De acordo com FERREIRA et al. (2004) avaliando a capacidade de reparação óssea em defeito crítico de calvárias de ratos empregando um *pool* de proteínas morfogenéticas bovinas ligado à hidroxiapatita sintética absorvível microgranular, observaram histologicamente que nos períodos de 1 a 3 meses, os defeitos estavam preenchidos por tecido conjuntivo fibroso e inúmeros focos de reação granulomatosa do tipo corpo estranho, ao redor de aglomerados de hidroxiapatita, inibindo a formação óssea.

Segundo ALMEIDA et al. (2000) a interposição de células não osteogênicas na área do defeito cirúrgico impede a migração de células com potencial osteogênico, interferindo diretamente no processo de reparo ósseo, como também foi observado em estudo realizado por ALMEIDA et al. (2006), avaliando o efeito do *Plumbum metallicum* 30ch, medicamento homeopático a base de chumbo, na reparação óssea em mandíbulas de ratos sem utilização de barreira mecânica, havendo presença de tecido muscular em diversos cortes histológicos.

O grau de danos aos tecidos conjuntivos frouxos adjacentes ao defeito ósseo interfere no modelo experimental de lesão óssea (SARTORI et al., 2008). Embora o tecido conjuntivo frouxo na espécie animal e região estudada ser bastante delgado, o grau de interferência do mesmo no reparo do tecido ósseo foi extremamente elevado, impedindo a ação direta da Cramoll-1,4 sobre tecido ósseo.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que não foram encontradas alterações significativas quanto às dosagens bioquímicas séricas e ósseas e quando presentes estavam relacionados ao efeito do trauma induzido. Apesar da eficácia comprovada do emprego das lectinas em experimentos sobre reparação de pele, podemos afirmar que, no que diz respeito à reparação do tecido ósseo a Cramoll-1,4 em formulação em gel irradiado na concentração de 300 µg/100 µl não promoveu estimulação óssea que favorecesse o processo de reparo, uma vez que houve interferência direta do reparo do tecido conjuntivo frouxo, impedindo o contato direto do material implantado com a interface óssea.

AGRADECIMENTOS

Núcleo de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde da UFPE e ao Departamento de Energia Nuclear – UFPE/FINEP. (ULAB) do Hospital das Clínicas da UFPE.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, E.R.C. Experimental cutaneous wounds treated with *Cratylia mollis* seed lectin: healing, histopathological aspects and microbiological analyses. 2006. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.
- ALMEIDA, J.D. et al. Estudo da reparação óssea em mandíbula de ratos. Revista da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, v. 3, n. 1, jan./jun., 2000.
- ALMEIDA, J.D. et al. Estudo do efeito do *Plumbum metallicum* 30ch na reparação óssea em mandíbula de ratos sem barreira mecânica. Revista Ciência Odontológica Brasileira, v. 9, n. 1, p. 69-76, jan./mar., 2006.

ALMEIDA, J.M. et al. Estudo histomorfométrico do processo de cicatrização óssea em defeitos cirúrgicos de tamanho crítico em calvárias de ratos preenchidos com polímero de mamona. Revista Odontológica de Araçatuba, v.31, n.1, p. 22-27, Janeiro/Junho, 2010.

AMADEI, S.U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.42, n.1, p.5-12, 2006.

BARROS, L.F.M. et al. Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPS): modo de ação, aplicação e carreadores. Artigo de Revisão. Ciência Veterinária nos Trópicos, Recife-PE, v. 9, n. 1, p. 1 - 8 – jan./abr., 2006.

Baseline Hematology and Clinical Chemistry Values for Charles River Wistar Rats (CRL:(W)BR) as a function of sex and age. Charles River Technical Bulletin, v. 1, n. 2, 1993).

BAUCK, L.; BIHUN, C. Basic Anatomy, Physiology, Husbandry, and Clinical Techniques. In:_____. Ferrets, Rabbits and Rodents: clinical medicine and surgery, cap. 26, parte 1, p. 291-306, 1997.

BUSER D. et al. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration I. Surgical produce in the maxilla. The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, v. 13, p. 29-45, 1993.

CAVADA, B.S. et al. Purification and Characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. Phytochemistry, v. 49, p. 675-680, 1998.

COHEN, A.J.; ROE, F.J.C. Review of risk factors for osteoporosis with particular reference to a possible etiological role of dietary salt. Food and Chemical Toxicology. v. 38, p. 237-253, 2000.

FERREIRA, G.R. et al. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. Brazilian Dental Journal., v. 15, n. 3, 2004.

GABIUS, H. J., GABIUS, S. Glycosciences: Status and perspectives. 2. ed. New York: Wiley-VCH, p. 659, 2002.

ISIDRO, R. et al. Ação das lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. Sob comportamento da saúva do nordeste (*Atta opaciceps* Borgmeier, 1939). Revista da Faculdade de Agronomia de Maracay, v.25, p. 77-86, 2001.

LIMA-RIBEIRO, M.H.M. et al. *In vitro* Evaluation of Influence of Gamma Radiation on a Gel Formulation of a *Cratylia mollis* Lectin. Anais... 3º Cong. Br. Biotecnologia, Fortaleza, CE, p. 67, 2010.

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

MENDONÇA, J.C.G. Estudo morfológico comparativo do enxerto ósseo autógeno e o polímero de mamona em rebordo infra-orbitário em coelhos. 47 f. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade Federal de Campo Grande – Mato Grosso do Sul. 2004.

MITRUKA, B.M.; RAWNSLEY, H.M. Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals. New York: Masson Publishing, 1977.

MONTEIRO, B.S. Contribuição do plasma rico em plaquetas na reparação óssea de defeitos críticos criados em crânios de camundongos. *Ciência Rural*, v.40, n.7, p. 1590-1596, 2010.

MOREIRA, R. A. et al. Plant lectins, chemical and biological aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 211-218, 1991.

NICHOLS, J.B. The Laboratory rat. Florida Atlantic University, Veterinary Services. 2003, Disponível em: <<http://www.fau.edu/research/ovs/VetData/rat.php>> Acesso em: 29 nov., 2009.

NORDIN, B.E. Calcium and osteoporosis. Review. *Nutrition*, n. 718, v. 13, p. 1-23, 1997.

OLFERT, E.D.; CROSS, B.M.; McWILLIAM. Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care, v. 1, 1993.

PECORA G. et al. Bone regeneration with a calcium sulfate barrier. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 84, p. 424-429, 1997.

SARTORI, A.R. et al. Comparação do processo de reparo ósseo em tíbias de ratas normais e osteopênicas. *Acta Ortopédica Brasileira*, v. 16, n. 1, p. 37-40, 2008.

SCHIMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, Philadelphia, n. 205, p. 299-308, Apr. 1986.

SCHIRATO, G. V. et al. Efeito da lectina de *Canavalia brasiliensis* no tratamento tópico de feridas cutâneas experimentais em camundongos. In: REUNIÃO REGIONAL NORDESTE DA SBBQ E 2ND INTERNATIONAL SYMPOSIUM IN BIOCHEMISTRY OF MACROMOLECULES AND BIOTECHNOLOGY, 7., 2004, Recife. **Anais...** Recife: Editora Universitária da UFPE, 2004, p. 159-161.

SEAL, B. L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. A polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering: Reports.*, v.34, n.4-5, p.147-230, Oct. 2001.

SEO, B.M. et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Diseases*, v.14, p.428-434, 2008. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119877726/PDFSTART>. Acesso em: 22 maio, 2011.

STEIN, G.S.; LIAN, J.B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology*, v. 14, p. 424-442, 1993.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos. Editora Guanabara Koogan S.A. 11. Ed., Rio de Janeiro, p. 471-473, 1993.

TAKADA, Y. et al. Milk whey protein enhances the bone breaking force in ovariectomized rats. **Nutrition** Research, Tarrytown, v. 17, n. 11, p. 1709-1720, Nov. 1997.

WIKESJÖ, U.M.E.; SELVIG, K.A. Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol* 2000. v. 19, p. 21-39, 1999.

Efeito da aplicação tópica do hidrogel isolectina (Cramoll-1,4) em queimaduras de segundo grau: Modelo experimental

Danielle dos Santos Tavares Pereira¹, Maria Helena Madruga Lima-Ribeiro^{2,3}, Ralph Santos-Oliveira⁴, Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti², Nicodemos Teles de Pontes-Filho⁵, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho⁶, Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão³, Maria Tereza dos Santos Correia⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Autor para correspondência.

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;

³Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;

⁴Instituto de Engenharia Nuclear, Divisão de Radiofarmácia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

⁵Departamento de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil;

⁶Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar a eficiência de reparação da lectina hidrogel em um modelo animal para queimaduras de segundo grau. Vinte ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos (G1 = tratamento com hidrogel contendo 100 µg/mL da isolectina Cramoll-1,4 e G2 = grupo controle, hidrogel). Os resultados mostraram que hidrogel de isolectina promove tecido de granulação, menor reepitelização e maior percentual de contração da queimadura térmica em comparação com o veículo usado como um controle. A análise histológica da reparação das queimaduras de segundo grau tratadas topicamente com isolectina confirma estas observações. Não houve diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados. Estes resultados estendem o potencial de aplicações terapêuticas para Cramoll isolectin 1,4 que pode ser usado em combinação com outros produtos derivados no tratamento de queimaduras térmicas.

Palavras-chave: Hidrogel; Cramoll-1,4; queimaduras de 2º grau; reparação tecidual.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the efficiency of repair of the hydrogel lectin in an animal model for second-degree burns. Twenty rats were randomly divided into two groups (G1 = treatment with hydrogel containing 100 µg/mL of isolectina Cramoll-1,4 and G2 = the control group, hydrogel). The results showed that hydrogel isolectina promotes granulation tissue, epithelialization and less contraction of the highest percentage of thermal burn compared with the vehicle used as a control. Histological analysis of repair of second-degree burns treated topically with isolectina confirms these observations. There were no significant differences in biochemical and hematological parameters analyzed. These results extend the potential therapeutic applications for isolectin Cramoll-1,4 that can be used in combination with other products in the treatment of thermal burns.

Keywords: Hydrogel; Cramoll-1,4; Thermal burns 2nd degree; Tissue repair.

INTRODUÇÃO

Desde a pré-história, plantas e seus derivados foram usados para tratar feridas. Cramoll-1,4 é uma lectina extraída de sementes de *Cratylia mollis* Mart, uma planta nativa do nordeste do Brasil. A Cramoll-1,4 é específica para glicose/manose. Quatro formas múltiplas foram purificadas a partir de *C. mollis* - Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4 e preparações que contenham várias formas combinadas como as de 1 e 4, com o nome Cramoll-1,4 [1]. Estudos têm demonstrado que a Cramoll-1,4 é capaz de: i) isolar glicoproteínas do plasma humano [2], ii) com a caracterização transformar tecido mamário [3], iii) induzir atividade mitogênica em linfócitos humanos [4], iv) produzir IFN- γ e óxido nítrico [5] e v) atividades antitumorais [6].

Queimaduras são um dos problemas de saúde nas sociedades modernas e danos irreparáveis podem estar associados a muitos problemas para os pacientes e suas famílias [7]. As queimaduras são classificadas por sua profundidade e gravidade, tais como 1°, 2°, 3° e 4° graus. A reação fisiopatológica a uma queimadura é complexa e varia de acordo com a causa (térmica, elétrica, química ou radiação). Em lesões térmicas mudanças na queimadura são causadas

principalmente pelos efeitos diretos do calor, mas sobreposto a essas mudanças tem-se um processo inflamatório agudo. É este último que representa os efeitos devastadores e generalizados e queimaduras graves alteram a função homeostática todo o corpo [8]. Além da morbidade fisiológica da queimadura esses tipos de lesões são associados a um enorme fardo financeiro sobre o sistema público de saúde.

A fim de aliviar a dor da queimadura e minimizar o número de trocas de curativos, vários estudos têm sido realizados em busca de formulações que ajudem no reparo tecidual. O advento das ataduras secas teve início no século XIX devido à teoria dos germes de autoria de Louis Pasteur. No século XX, com os avanços no conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no reparo da lesão tecidual, a teoria de que as feridas em um ambiente úmido têm melhor capacidade de reparação foi desenvolvida [9]. Neste sentido, com o objetivo de avaliar os efeitos da aplicação tópica de hidrogel contendo isolectina de Cramoll-1,4, este estudo investigou *in vivo* as características clínicas e histopatológicas de queimaduras de segundo grau térmicas demonstradas experimentalmente em ratos da linhagem *Wistar*.

METODOLOGIA

***Cratylia mollis* (Extração e Purificação)**

Lectina Cramoll-1,4 foi purificada a partir de 10% (w:v) de extrato de sementes de *Cratylia mollis* em NaCl 0,15 M [10]. As sementes (feijão camaratú) coletadas na cidade de Ibimirim, estado de Pernambuco, foram lavadas com água destilada, secas à temperatura ambiente e misturados em NaCl 0,15 M. Após 16 h de agitação delicada a 4° C, o extrato foi filtrado e centrifugado por 12 000 g. Foi então fracionado com Sulfato de amônio, dialisado com NaCl 0,15 M (fração 40-60%) e foi realizada a cromatografia de afinidade em Sephadex G-75 M (Sigma Chemical Company) em coluna (70,0 x 1,9 cm) contendo 200 mL, equilibrada com NaCl 0,15 M. Após a aplicação da amostra, NaCl 0,15 M foi passada através da coluna até A280 nm que fosse inferior a 0,1; lectina foi eluída com 0,3 M de glicose em NaCl 0,15 M. Frações com maiores que A280 nm foram agrupadas,

exaustivamente dialisadas em tampão citrato fosfato e, em seguida, liofilizada. A lectina nativa tem 8,5-8,6 pI medido por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida e 31 Kda principais polipeptídeos.

Hidrogel

Polímero de Carbopol® foi usado como veículo. O polímero foi suspenso em tampão de Ácido bórico (pH 6,0) a 25° C. Soluções de Cramoll-1,4 foram adicionadas ao polímero em pó e dissolvidas em solução tampão Ácido bórico em quantidades necessárias para atingir Cramoll-1,4 numa concentração final de 100 µg de gel/mL. Irradiação foi realizada à temperatura ambiente usando Co⁶⁰ a 15 kGy h⁻² [11].

Avaliação da Atividade Hemaglutinante do Hidrogel Isolectina

A atividade hemaglutinante foi realizada em placas de microtitulação de acordo com Correia & Coelho [10]. Amostras de hidrogel de isolectina e da isolectina nativa (50 µL), irradiadas ou não, nas concentrações de 50 e 100 µg foram serialmente diluídas em 0,15 M NaCl antes de adicionar 5 µL (v/v) de uma suspensão de eritrócitos de coelho 2,5% previamente tratada com glutaraldeído. O título foi expresso como a maior diluição mostrando atividade hemaglutinante. Para cada amostra a avaliação da atividade hemaglutinante foi feita em triplicata.

Animais e Feridas Experimentais

Animais

Todos os animais receberam cuidados humanitários e estudos reportados neste manuscrito foram realizados em conformidade com as diretrizes para o tratamento de animais estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (23076.015015/2009-31). Um total de 20 ratos *Wistar (Rattus norvegicus, albinus)*, com 8-10 semanas de idade e pesando cerca de 250 ± 50 g foram utilizados neste estudo e tratados por

um período de 35 dias. Ração peletizada e água foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

Queimaduras

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 10 (G1 e G2) e pré-anestesiados com Sulfato de atropina, $0,04 \text{ mg/kg}^{-1}$ por via intramuscular. Depois de 10 minutos foi aplicada uma combinação anestésica através de uma injeção intramuscular de Cloridrato de xilazina 10 mg/kg^{-1} e Cloridrato de ketamina 90 mg/kg^{-1} com posterior tricotomia do dorso pela tração direta dos pêlos (área aproximada de 3 cm^2) (Figura 1A) e anti-sepsia com 1% de polivinilpirrolidona-iodo. Queimaduras foram causadas simetricamente através do contato com uma barra de alumínio ($r = 10 \text{ mm}$), pré-aquecido a 100° C por 10s (Figura 1B). Após a indução do ferimento por queimadura e despertar do animal, a analgesia foi processada por meio de aplicação intramuscular Dipirona sódica ($0,01 \text{ mg kg}^{-1}$). As lesões foram observadas durante 35 dias consecutivos, seguida da aplicação de $100 \mu\text{L}$ de hidrogel sobre a queimadura (Figura 1C). O Grupo-1 foi tratado com hidrogel contendo $100 \mu\text{g}$ de Cramoll-1,4. O Grupo-2 (controle) foi tratado com hidrogel sem lectina.

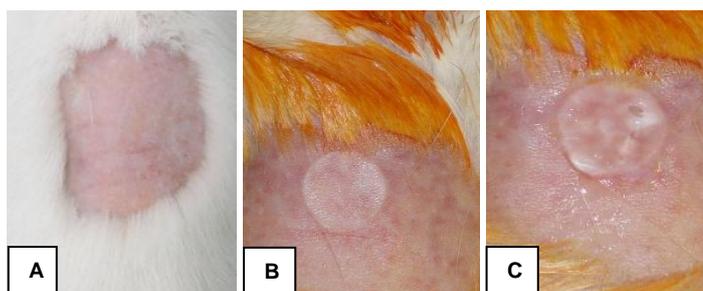


Figura 1: Indução de queimaduras de segundo grau térmicas em ratos *Wistar* machos. A - tricotomia por tração direta dos pêlos da região dorsal do animal; B – queimadura térmica de segundo grau com $r = 10 \text{ mm}$; C - tratamento de queimadura térmica usando $100 \mu\text{L}$ de hidrogel.

Observações Patológicas

Parâmetros Clínicos

Superfícies de queimaduras foram avaliadas com base nos seguintes parâmetros durante 35 dias consecutivos: edema, exsudação, hiperemia e a

firmeza da superfície da ferida, presença ou ausência de tecido de granulação e tecido cicatricial. Feridas foram consideradas fechadas se tecido de granulação úmido já não era aparente e as feridas pareciam cobertas com novo epitélio. O peso corporal foi determinado utilizando balança eletrônica (precisão g) no dia da indução de queimadura, bem como dia 7, 14, 21, 28 e 35 após a indução da queimadura.

Quantificação da Retração da Ferida

Todos os ratos foram examinados semanalmente sob anestesia para a observação de contratura da ferida. A retração da ferida foi avaliada nos dias 7, 14, 21, 28 e 35 após a indução da queimadura. Contração da ferida foi expressa como percentual de redução no tamanho da ferida original. Percentual de contração da ferida no dia-X = $[(\text{área no dia 0} - \text{área aberta no dia-X})/\text{área no dia 0}] \times 100$ [12].

Avaliações Bioquímicas e Hematológicas

Com os animais devidamente anestesiados, foram coletados 4 mL de sangue por punção cardíaca nos dias 7, 14, 21, 28 e 35 após a indução queimadura para determinação bioquímica. Níveis de creatinina, uréia, transaminase glutâmica pirúvica, transaminase glutâmica oxalacética, transferase glutâmica gama, fosfatase alcalina, amilase, cálcio, protrombina e fibrinogênio foram determinados. Parâmetros hematológicos totais (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) foram determinados imediatamente após a coleta de sangue. Os animais foram então submetidos à eutanásia através de injeção intraperitoneal de 30 mg kg^{-1} de Tiopental sódico.

Histopatologia

Após a coleta, amostras de tecido foram fixadas em formol 4% (v/v) preparado em PBS (0,01 M, pH 7,2), seguido pelo processamento histológico através da inclusão em parafina, microtomia com cortes de 4 μm e coradas pelo Tricrômico de Masson e Hematoxilina-Eosina. A análise histológica foi realizada por análise descritiva comparativa dos grupos experimental em microscópio óptico binocular (Zeiss - modelo Axiostar) em que as características celulares e teciduais da pele foram avaliadas após a lesão térmica e padrão de reparação tecidual subsequente.

Estatística

Os dados foram analisados utilizando testes não-paramétricos. Para detectar diferenças entre os grupos, o teste de Mann-Whitney U foi usado. Todos os resultados foram expressos como valores médios de grupos \pm desvio padrão e analisados considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em geral, todos os animais estavam clinicamente bem (apresentando comportamento normal da espécie e ingestão de alimentos e água) durante os experimentos. Não foi observado sangramento durante a cirurgia. Nem os ratos em tratamento e nem os animais do grupo controle mostraram quaisquer alterações estatisticamente significativas no peso corporal ao longo dos experimentos, mostrando que a analgesia intuída foi adequada para a injúria provocada, uma vez que um dos principais sinais de dor está relacionado a alterações de comportamento e um dos mais expressivos é a anorexia [13].

Atividade Hemaglutinante

Observou-se que a Cramoll-1,4, na concentração de 50 μg , tanto a Cramol-1,4 nativa quanto a formulação em gel, quando sob o efeito da radiação perderam sua atividade hemaglutinante. Esse efeito não foi observado à medida que a concentração da lectina foi de 100 μg (Figura 2).

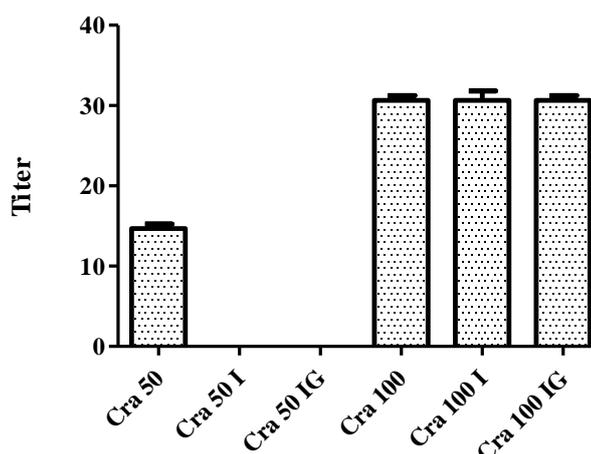


Figura 2: Avaliação da atividade hemaglutinante isolectina Cramoll-1,4 nativa e combinada com o hidrogel excipiente. Cra 50: Isolectina Cramoll-1,4 Pura a 50 µg/mL. Cra 50 I: Isolectina Cramoll-1,4 Pura a 50µg/mL irradiada (15 kGy h⁻²). Cra IG: Isolectina Cramoll-1,4 a 50 µg/mL associada com hidrogel e excipiente irradiados (15 kGy h⁻²). Cra 100: Isolectina Cramoll-1,4 Pura a 100 µg/mL. Cra 100 I: Isolectina Cramoll-1,4 Pura a irradiada (15 kGy h⁻²). Cra 100 IG: Isolectina Cramoll-1,4 Pura a 100 µg/mL associado com hidrogel e excipiente irradiados (15 kGy h⁻²). O título foi expresso como a maior diluição mostrando atividade hemaglutinante. Valores correspondem à Média ± SD.

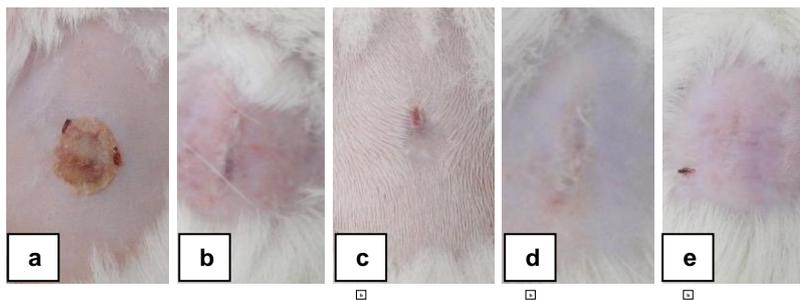
Vários aspectos fazem do hidrogel uma bandagem ideal para o tratamento de lesões teciduais, tais como: hidrofiliçidade, biocompatibilidade, não toxicidade, biodegradabilidabilidade, fácil substituição, transparência, aderência, absorção, e prevenção de perdas de fluido corporal [14, 15]. Burd [16] avaliou o uso de curativos de folha de hidrogel no tratamento de feridas queimadas abrangentes, observando que o uso do hidrogel no tratamento de feridas queimadas reduz a sensação da dor do paciente. Osti [17] avaliou o uso de uma película adesiva transparente possuindo permeabilidade seletiva combinados com um hidrogel (Burnshield) no tratamento de queimaduras. Por cerca de dois anos, este tipo de terapia foi usada no tratamento de primeiros socorros de 48 pacientes com queimaduras, 4 foram perdidos durante a terapia e 4 não estavam disponíveis para acompanhamento. Na fase de reepitelização complicações foram registradas em oito dos 40 pacientes: sete (18%) tiveram a inflamação residual e 1 (2%) apresentava cicatriz hipertrófica. Durante o seguimento, complicações tardias foram observadas em 2 (5%) dos 40 pacientes. Um gel foi utilizado em 8

pacientes: em 6 dos 7 pacientes com inflamação residual a complicação foi resolvida, enquanto na 1, apesar da terapia, a inflamação residual evoluiu para cicatriz hipertrófica.

Parâmetros Clínicos

Hidrogéis são estruturas tridimensionais com alta porcentagem de água que podem ser transferida do gel para a ferida para facilitar a sua hidratação. O processo de reparação tecidual de animais após queimaduras térmicas tratadas topicamente com a isolectina, tiveram melhor resposta do que o controle no exame clínico de várias maneiras, tais como: (1) presença de edema nas primeiras 24 horas após a indução de queimadura térmica de segundo grau, (2) espessamento da crosta, que começou a surgir espontaneamente em seis dias de experimento, (3) hiperemia discreta observada no intervalo entre 24 e 48 h após a lesão; (4) presença de tecido cicatricial, com 13 dias de experimento (Figura 3). Durante o período de estudo as lesões não mostraram sinais de infecção. Pele severamente queimada deixa de desempenhar a sua proteção natural e papel de barreira e permite um aumento dramático na perda de água e pode se tornar uma porta para a invasão bacteriana. O tratamento local de queimaduras de segundo grau é destinado para a manutenção de um microambiente úmido e estimulando a formação de um tecido de granulação bem vascularizado, favorecendo a reepitelização da lesão, evitando o desenvolvimento de micro-organismos, que é capaz de retardar ou impedir fenômenos biológicos da reparação tecidual e reepitelização [18].

G1



G2



Figura 3: Avaliação clínica da reparação tecidual de queimaduras de segundo grau em ratos *Wistar* machos. G1: grupo experimental tratado com hidrogel contendo isolectinas Cramoll-1,4 a 100 µg/mL. **A** – Aspecto da lesão térmica após sete dias de tratamento, macroscopicamente apresenta crosta seca e delgada com despreendimento das bordas. **B** - Aspecto da lesão térmica após 14 dias de tratamento, ausência de crosta e presença de tecido cicatricial. **C** - Aspecto da lesão térmica após 21 dias de tratamento, presença de tecido cicatricial e pequeno ponto de despreendimento da crosta. **D** - Aspecto da lesão térmica após 28 dias de tratamento, presença apenas de tecido cicatricial. **E** - Aspecto da lesão térmica após 35 dias de tratamento, visualização de um discreto tecido cicatricial. **G2:** Grupo controle tratado com aplicação tópica de hidrogel excipiente. **F** - Aspecto da lesão térmica após sete dias de tratamento, visualização de crosta seca e delgada com despreendimento das bordas. **G** - Aspecto da lesão térmica após 14 dias de tratamento, ausência de crosta e presença de tecido cicatricial. **H** - Aspecto da lesão térmica após 21 dias de tratamento, presença de tecido cicatricial, com ponto de despreendimento da crosta. **I** - Aspecto da lesão térmica após 28 dias de tratamento, presença de tecido cicatricial e uma segunda crosta. **J** - Aspecto da lesão térmica após 35 dias de tratamento, visualização de tecido cicatricial.

Quantificação da Retração da Ferida

A contração da ferida é um parâmetro utilizado para avaliar o reparo de feridas. A área da lesão diminuiu gradualmente com o passar do tempo de reparo tecidual em ambos os grupos. No entanto, o G1 apresentou a maior taxa de contração da lesão quando comparado com o G2, indicando que a isolectina tem o efeito de induzir a contração da lesão, como ilustrado na Figura 4. Estes

resultados são consistentes com estudos *in vitro* e *in vivo* realizado por Sezer et al. [19], que demonstraram a eficácia de hidrogéis no tratamento de queimaduras na derme de coelhos revelando que a aplicação de hidrogel fucoidan-quitosana promove a contração da ferida da queimadura e induzindo a reparação tecidual. Contração da ferida, processo de encolhimento da ferida, depende de habilidades reparativas do tecido, a extensão e tipo de danos e saúde do tecido e estado geral [20]. Por outro lado, a contração da ferida raramente é capaz de levar ao seu encerramento definitivo, que é principalmente devido à presença de fibroblastos encontrados no tecido de granulação que posteriormente se diferenciam em miofibroblastos [21].

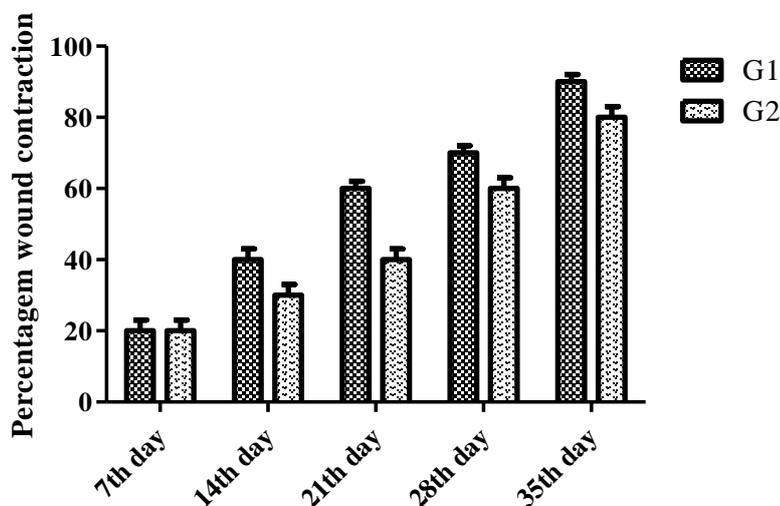


Figura 4. Efeito da aplicação tópica de hidrogel na ferida queimada expresso em percentagem de contração da ferida. G1 = tratamento, G2 = controle. Valores representam a Média \pm SD. * $p < 0,05$.

Considerando as atividades imunoestimulatórias e mitogênicas, o emprego terapêutico das lectinas em processos de reparação tecidual tem sido objeto de diversas pesquisas quer seja relacionado à concentração da lectina ou à formulação empregada. Yasuoka et al. [22] utilizaram lectinas de *Phaseolus vulgaris* (PHA) e lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis*, Concanavalina A (ConA) em úlceras intestinais induzidas pelo uso da indometacina em ratos, sendo observada uma reparação tecidual mais rápida dos animais tratados com estas lectinas.

Em estudos realizados por Melo et al. [23,24] foram avaliados efeitos sobre o reparo de lesões cutâneas em camundongos normais e imunossuprimidos pelo emprego do Metotrexato, utilizando as isoformas 1 e 4 da lectina de *Cratylia mollis* os quais apresentaram suas lesões eficientemente reparadas em menor tempo.

Avaliações Bioquímicas e Hematológicas

Valores hematológicos obtidos neste estudo tanto do grupo tratado como do grupo controle não apresentaram alterações significativas em função da indução de queimadura durante o período analisado (Eritrócitos: $7,6 \pm 0,48$; Hemoglobina: $13,65 \pm 0,5$; Plaquetas: $846.400 \pm 0,71$, Leucócitos: $7.980 \pm 0,71$; Basófilos: $0,2 \pm 0,05$; Eosinófilos: $1,38 \pm 0,18$; Linfócitos: $82,37 \pm 0,83$; Monócitos: $1,9 \pm 0,2$), revelando em percentual valores totais normais em ratos [25]. Ratos, como outros mamíferos, têm que manter o controle estrito do ambiente interno, garantindo a homeostase. Sabe-se que ratos podem produzir mudanças nestes parâmetros, como resultado de processos patológicos ou fatores externos, tais como sexo, ascendência, idade, alimentação, manejo e ambiente [26].

No entanto, os valores médios dos parâmetros bioquímicos analisados neste estudo foram consistentes com os dados anteriormente relatados específicos para animais normais em percentual de valores totais (Cálcio: $10,04 \pm 0,42$; Pro-trombina: $9,94 \pm 0,16$; Fibrinogênio: $457,32 \pm 0,25$; Fosfatase alcalina: $212,68 \pm 0,52$; Transaminase glutâmica oxálica: $180,02 \pm 0,35$; Transaminase glutâmica pirúvica: $53,28 \pm 0,41$; Transpeptidase glutâmica gama: $5,76 \pm 0,23$; Creatina: $0,54 \pm 0,04$; Uréia: $46,34 \pm 0,04$ e Amilase: $842,06 \pm 0,48$). A avaliação bioquímica revelou níveis aumentados de Transaminase glutâmica pirúvica assim como da Fosfatase alcalina em resposta à injúria, relacionados ao período inflamatório do processo de reparação tecidual. Por outro lado, alterações metabólicas são consideradas de alto risco em queimaduras de terceiro grau como hiperglicemia [27] e aumento do catabolismo protéico [28] como os principais fatores agravantes para a injúria.

Após o trauma da queimadura, mediadores inflamatórios, radicais livres de oxigênio, metabólitos do ácido araquidônico e complementos [29], lançados nas feridas promovem um grande edema. De acordo com Beukelman et al. [30] hidrogel, lipossomas, com 3% de iodo-povidona (PVP-ILH, Repithel[®]) tem

demonstrado benefício clínico em ambientes onde inflamação e/ou espécies reativas de oxigênio são pensados para impedir a reparação de feridas (por exemplo, queimaduras e feridas crônicas em fumantes). De acordo com Moller-Kristensen et al [31], a lectina ligante de manose, modula, não apenas fatores inflamatórios como citocinas e quimiocinas, mas também moléculas de adesão celular, a proteína fator de crescimento e de ligação, em particular metaloproteinases, que são os mais prováveis efetores diretos no despreendimento das crostas.

Considerando-se a influência dos carboidratos em inúmeros fenômenos de sinalização celular sejam eles fisiológicos ou patológicos, o emprego de proteínas que se ligam a resíduos desses carboidratos pode ser proposto com o objetivo de desenvolvimento e modulação de eventos como comunicação, diferenciação e proliferação celular [32, 33, 34].

Histopatologia

Queimaduras profundas de espessura parcial são as lesões que causam destruição parcial ou total de terminações nervosas, folículos capilares e glândulas sudoríparas. Em ambos os grupos, no sétimo dia, foi observada intensa presença de fibroblastos, neovascularização, necrose e edema. Na camada superior da derme, folículos pilosos e sebáceos e glândulas sudoríparas desapareceram e apenas seus corpos residuais foram encontrados. Vasos capilares foram danificados. A epiderme mostrou necrose com infiltração de um grande número de neutrófilos e poucos monócitos, leucócitos e plasma da derme (Figura 5B). Estes dados são semelhantes às observações relatadas por Nunes et al. [35] que, ao avaliar a aplicação de uma película de colágeno contendo ácido usnico como curativo para o tratamento de queimaduras de segundo grau térmico encontrou intensa resposta inflamatória após 7 dias de indução da queimadura com presença de neutrófilos distribuídos por todo o comprimento da queimadura.

Com 14 dias de experimento, a representação tecidual dos animais dos grupos G1 e G2 revelou tecido de granulação com presença de neovascularização discreta e neoformação de anexos da pele. Angiogênese é essencial para restaurar o fornecimento de nutrientes e oxigênio durante a reparação tecidual [36]. No grupo 1 foi observado aumento do número de fibroblastos e presença de

colágeno organizado no centro da lesão (Figura 5C). Experimentos realizados por Sezer et al. [37] demonstraram que fibroblastos e colágeno em grupos tratados com fucosphere aumentou em quantidades no 14° dia de experimento, em comparação à de sete dias, mas diminuiu no dia 21° dia após a indução da lesão. O tempo de reepitelização foi menor para os animais tratados com hidrogel isolectina e começou em torno da borda queimada no 14° dia de experiemnto. Epitelização é necessária à reparação de todos os tipos de ferimentos se a bolha de água ocorrer. Proteção contra líquidos e partículas, a contaminação e manutenção do meio interno são dependentes de características físicas da queratina [38]. As lesões térmicas experimentalmente induzidas foram completamente reepitelizadas em ambos os grupos, com 35 dias após a indução da queimadura.

O exame histopatológico revelou a proliferação de fibroblastos intensa no 21° dia de experimento, presença de colágeno denso não modelado e fibrose moderada (Figura 5D). Deposição de colágeno na fase de fibroplasia é necessária para a chegada eficiente de fibroblastos para o local queimado. Fibroblastos maduros produzem uma matriz delicada que dá suporte mecânico para os capilares novos [39]. O colágeno depositado no local da lesão não terá a mesma organização única de um tecido intacto, sendo necessário um período de dois meses para completar a reestrutura [40]. A diminuição da espessura do epitélio no 21° após a indução da queimadura foi considerado por Sezer et al. [41] como o resultado da maior taxa de reparação tecidual, particularmente sobre a queimadura superficial da ferida tratada com quitosana em filme contendo fucoidan.

Após 28 dias de experimento, tanto G1 e G2 mostraram um decréscimo gradual no número de fibroblastos, com maior organização da matriz de colágeno com infiltrado inflamatório reduzido (Figura 5E). Finalmente, 35 dias após a queimadura o tecido lesado do grupo G1 está em fase de maturação e remodelação, com a presença de poucos fibroblastos e células inflamatórias (Figura 5F).

A análise histológica das seções de fígado no grupo G1 não mostrou efeitos citotóxicos resultantes da aplicação tópica de hidrogel isolectin no final do tratamento após 35 dias.

Vários estudos têm confirmado o uso das lectinas na ativação do sistema imune, recrutando neutrófilos através de mecanismos indiretos [42], promovendo efeitos pró-inflamatórios em células polimorfonucleares e induzindo a liberação de citocinas [43], bem como provocando a proliferação de fibroblastos [44]. Ensaios anteriores realizados por nosso grupo têm mostrado uma atividade potencial pró-inflamatória e imunomoduladora induzida pela lectina Cramoll-1,4. A importância de glicoproteínas (inclusive lectinas) como componentes do gel de extrato de *Aloe vera* foi confirmada pela promoção da reparação de lesões cutâneas por queimadura por congelamento e ainda mostrando propriedades anti-inflamatórias e antifúngicas [45]. Sell & Costa [46] também descreveram efeito melhorado de lectina PHA no processo de reparação da pele de tecidos de ratos *Wistar* em comparação com *Triticum vulgare* (WGA) e lectina de *Artocarpus integrifolia* (jacalina).

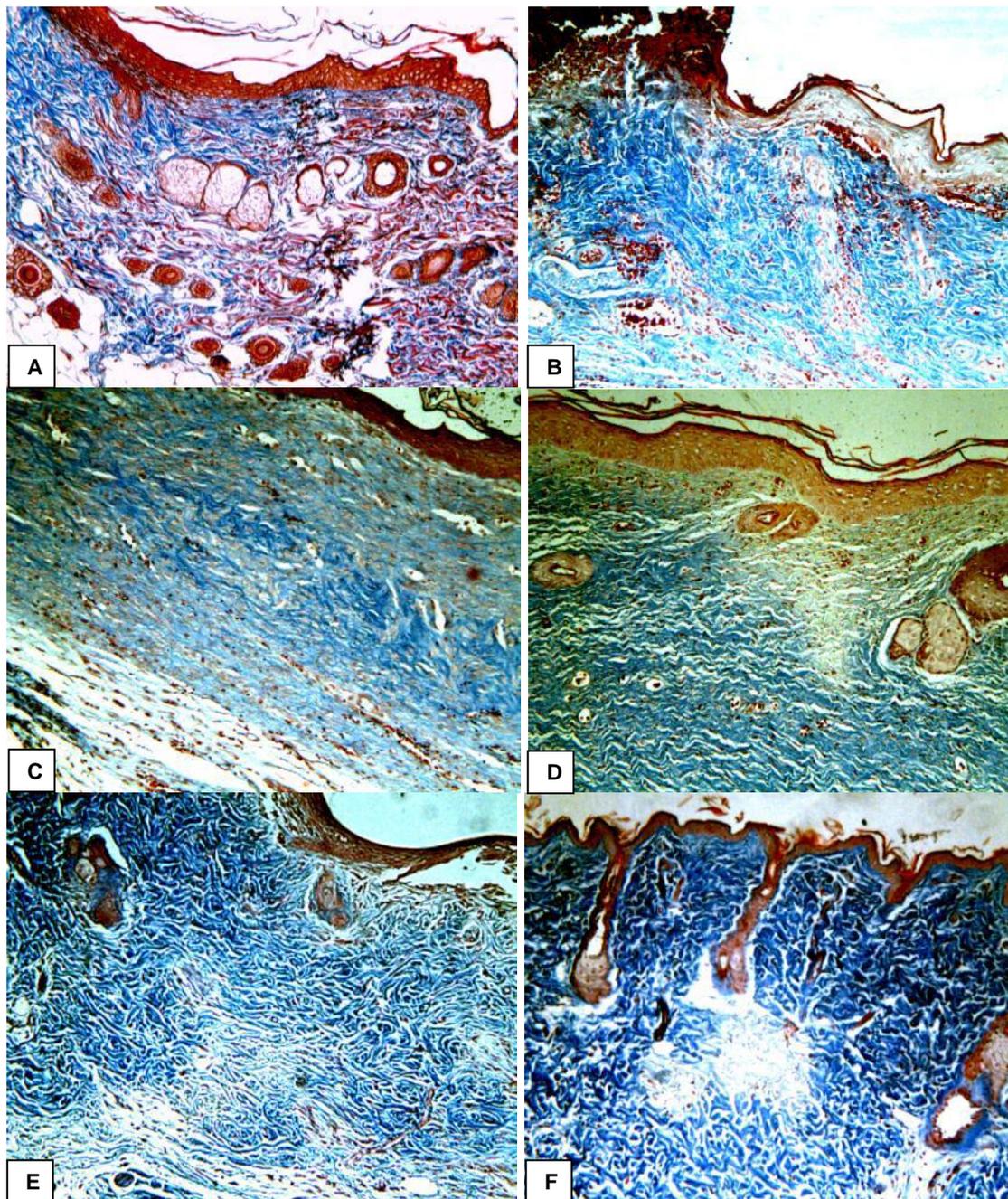


Figura 5: Tecido epitelial de ratos submetidos a queimaduras térmicas de segundo grau. Coloração Tricrômico de Masson. Ampliação 100x. **A** - Tecido epitelial normal com todos os anexos da pele. **B** - Animal apresentando tecido epitelial com a destruição completa da derme e epiderme mostrando exsudatos intensos de albumina/leucócitos/macrófagos, necrose, edema e crostas no dia 7 após a indução da lesão. **C** - Animal no dia 14 com tecido de reepitelização, autólise moderada, moderado exsudato albumina/leucócitos/macrófagos, neovascularização intenso, proliferação de fibroblastos discreta com a presença de colágeno frouxo e fibrose leve. **D** - Animal no dia 21 com a reepitelização do tecido incompleta, leve exsudato albumina/leucócitos/macrófagos, neovascularização moderada, intensa proliferação fibroblástica, presença de colágeno denso não modelado e fibrose moderada. **E** - Animal no dia 28 com epitelização completa dos tecidos, exsudato albumina/leucócitos/macrófagos discreto na epiderme, proliferação fibroblástica moderada, presença de malha de colágeno denso modelado e fibrose moderada. **F** - Animal no dia 35 com reepitelização completa, exsudato discreto albumina/leucócitos/macrófagos na epiderme, proliferação fibroblástica moderada, presença de malha de colágeno denso modelado e fibrose moderada.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a aplicação tópica regular durante 35 dias de hidrogel contendo Cramoll-1,4 no tratamento de queimaduras de segundo grau acelera a granulação, processo de reepitelização e retração da ferida. Estes resultados estendem o potencial de aplicações terapêuticas da isolectina Cramoll-1,4, que pode ser usado em combinação com outros produtos derivados no tratamento de queimaduras térmicas.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam sua gratidão a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelas bolsas de pesquisa, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) ao apoio financeiro e Adriana Cruz pela assistência técnica.

REFERÊNCIAS

- [1] G.A. TAVARES, I. CARACELLI, R. BURGER, M.T.S. CORREIA, L.C.B.B. COELHO, G. OLIVA, “Crystallization and preliminary X-ray studies on the lectin from the seeds of *Cratylia mollis*”, *Acta Crystallographica Section D*, vol. 52, pp. 1046-1047, 1996.
- [2] V.L.M. LIMA, M.T.S. CORREIA, Y.M.N. CECHINEL, C.A.M. SAMPAIO, J.S. OWENAND, L.C.B.B. COELHO, “Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 33, pp. 27–32, 1997.
- [3] E.I.C. BELTRÃO, M.T.S. CORREIA, J. FIGUEREDO-SILVA, L.C.B.B. Coelho, “Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues”, *Applied Biochemistry Biotechnology*, vol. 74, pp. 125–134, 1998.
- [4] E.V.M. MACIEL, V.S. ARAÚJO-FILHO, M. NAKAZAWA, Y.M. GOMES, L.C.B.B. COELHO, M.T.S. CORREIA, “Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes”, *Biologicals*, vol. 32, pp. 57–60, 2004.

- [5] C.M.L. MELO, M.C.A.B. CASTRO, A.P. OLIVEIRA, F.O.S. GOMES, V.R.A. PEREIRA, M.T.S. CORREIA, L.C.B.B. COELHO, P.M.G. PAIVA, “Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes”, *Phytotherapy Research*, vol. 24, pp. 00–10, 2010.
- [6] C.A.S. ANDRADE, M.T.S. CORREIA, L.C.B.B. COELHO, S.C. NASCIMENTO, N.S. SANTOS-MAGALHAES, “Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes”, *Internation Journal of Pharma and Bioscience*, vol. 278, n. 2, pp. 435–44, 2004.
- [7] L.S. EDELMAN, “Social and economic factors associated with the risk of burn injury”, *Burns*, vol. 33, n^o. 8, pp. 958–65, 2007.
- [8] G.L. KRAMER, T. LUND, D. HERNDON, “Pathophysiology of burn shock and burn edema”, In: “*Total Burn Care*”, pp. 78-87, Herndon D. (ed.), W.B. Saunders, Philadelphia, 2002.
- [9] M.C. GUIMARÃES, “História do curativo”, In: “*Feridas e curativos: uma forma simples e prática de tratar*”, pp. 1-3, Rubio (ed.), Rio de Janeiro, 2011.
- [10] M.T.S. CORREIA, L.C.B.B. COELHO, “Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean)”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 55, pp. 261-273, 1995.
- [11] B.F.C. PATRICIO, M.H.M. LIMA-RIBEIRO, M.T.S. CORREIA, A.M.A. CARNEIRO-LEAO, M.S. ALBERNAZ, T. BARBOZA, S.A.L. SOUZA, R. SANTOS-OLIVEIRA, “Radiolabeling of cramoll 1,4: evaluation of the biodistribution”, *International Journal of Peptides*, vol. 2011, p. 1-3, 2011.
- [12] M.S. KUMAR, R. SRIPRIYA, H.V. RAGHAVAN, P.K. SEHGAL, “Wound healing potential of *Cassia fistula* on infected albino rat model”, *Journal of Surgical Research*, vol. 131, pp. 283-289, 2006.
- [13] HELLEBREKERS, L.J. Fisiopatologia da dor em animais e sua conseqüência para a terapia analgésica. In: _____ *Dor em animais*, São Paulo: Manole, cap. 5, p.69-79, 2002.

- [14] N. ROY, N. SAHA, P. HUMPOLICEK, P. SAHA, "Permeability and biocompatibility of novel medicated hydrogel wound dressings," *Soft Materials*, vol. 8, n. 4, pp. 338-357, 2010.
- [15] N. ROY, N. SAHA, T. KITANO, P. SAHA, "Novel hydrogels of PVP-CMC and their swelling effect on viscoelastic properties," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 117, n. 3, pp. 1703-1710, 2010.
- [16] A. BURD, "Evaluating the use of hydrogel sheet dressings in comprehensive burn wound care", *Ostomy Wound Manage*, vol. 53, n. 3, pp. 52-62, 2007.
- [17] E.M.D. OSTI, "Cutaneous burns treated with hydrogel (Burnshield) and a semipermeable adhesive film", *Archives of Surgery*, vol. 141, pp. 39-42, 2006.
- [18] J.G. HANCOK, J.L. JORIZZO, "Burns," *In: "Manual of Dermatologic Therapeutics"*, K. A. Arndt and J. T. S. Hsu, Eds., Lippincott Williams & Wilkins, 7th edition, 2007.
- [19] A.D. SEZER, E. CEVHER, F. HATIPOĞLU, Z. OĞURTAN, A.L. BAS, J. AKBUG, "Preparation of fucoidan-chitosan hydrogel and its application as burn healing accelerator on rabbits", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 31, n. 12, pp. 2326-2333, 2008.
- [20] N.S. ANUAR, S.S. ZAHARI, I.A. TAIB, M.T. RAHMAN, "Effect of green and ripe *Carica papaya* epicarp extracts on wound healing and during pregnancy", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, pp. 2384-2389, 2008.
- [21] R. O'LEARY, E.J. WOOD, P.J. GUILLOU, "Pathological acarring: strategic interventions", *European Journal Surgical Oncology*, vol. 168, pp. 523-534, 2002.
- [22] T. YASUOKA, M. SASAKI, T. FUKUNAGA, T. TSUJIKAWA, Y. FUJIYAMA, R. KUSHIMA, R.A. GOODLAD. "The effects of lectins on indomethacin-induced small intestinal ulceration", *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 84, pp. 231-237, 2003.
- [23] C.M.L. MELO, E.R. ALBUQUERQUE, M.R. MELO-JÚNIOR., C. BEZERRA, "Topical use of *Cratylia mollis* lectin in wound healing in mice". In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, XXX SBBq. *Anais...*, p. 112, 2003.

- [24] C.M.L., MELO, C.S. PORTO, M.R. MELO-JÚNIOR, C. M. MENDES, C.C.B. CAVALCANTI, L.C.B.B. COELHO, A.L.F. PORTO, A.M.A.C. LEÃO, M.T.S. CORREIA, "Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 408, pp. 113–119, 2011.
- [25] J.B. MESSIAS, M.C.M. CARACIOLO, I.M. OLIVEIRA, U.R. MONTARROYOS, M.O. GUERRA, I.A. SOUZA, "Parâmetros hematológicos de *Rattus norvegicus* obtidos através de métodos automatizado e não automatizado", *Medicina Veterinária*, vol. 3, n. 2, pp.1-8, 2009.
- [26] G.D. CARVALHO, A.P.B. MASSENO, M.S. ZANINI, S.F. ZANINI, L.C. PORFIRIO, J.P. MACAHADO, H. MAUAD, "Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos", *Ceres*, vol. 56, n. 1, pp. 051-057, 2009.
- [27] D.C. GORE, D.L. CHINKES, D.W. HART, S.E. WOLF, D.N. HERNDON, A.P. SANFORD, "Hyperglycemia exacerbates muscle protein catabolism in burn injured patients", *Critical Care Medicine*, vol. 30, n. 11, pp. 2438-42, 2002.
- [28] A. A. FERRANDO, M. SHEFFIELD-MOORE, S. E. WOLF, D. N. HERNDON, R. R. WOLFE, "Testosterone administration in severe burns ameliorates muscle catabolism", *Critical Care Medicine*, vol. 28, pp. 1936-42, 2001.
- [29] Y. YOUN, C. LALONDE, R. DEMLING, "The role of mediators in the response to thermal injury", *World Journal of Surgery*, vol. 16, pp. 30-6, 1992.
- [30] C.J. BEUKELMAN, A.J.J. VAN DEN BERG, M.J. HOEKSTRA, R. UHL, K. REIMER, S. MUELLER, "Anti-inflammatory properties of a liposomal hydrogel with povidone-iodine (Repithel[®]) for wound healing *in vitro*", *Burns*, vol. 34, pp. 845-855, 2008.
- [31] M. MØLLER-KRISTENSEN, M.R. HAMBLIN, S. THIEL, J.C. JENSENIUS, K. TAKAHASHI, "Burn injury reveals altered phenotype in mannan-binding lectin-deficient mice", *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 127, pp. 1524-1531, 2007.

- [32] R.A. MOREIRA, I.L. AINOZ, J.T.A. OLIVEIRA, B.S. CAVADA, "Plant lectins, chemical and biological aspects", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 86, pp. 211-218, 1991.
- [33] B.S. CAVADA, C.F. SANTOS, T.B. GRANGEIRO, E.P. NUNES, P.V.P. SALES, R.L. RAMOS, F.A.M. De SOUSA, C.V. CRISOSTOMO, J.J. CALVETE, "Purification and Characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke", *Phytochemistry*, vol. 49, pp. 675-680, 1998.
- [34] H.J. GABIUS, S. GABIUS, "Glycosciences: Status and perspectives". 2. ed. New York: Wiley-VCH, p. 659, 2002.
- [35] P.S. NUNES, R.L.C. ALBUQUERQUE-JUNIOR, D.R.R. CAVALCANTE, M.D. M. DANTAS, J.C. CARDOSO, M.S. BEZERRA, J.C.C. SOUZA, M.R. SERAFINI, L.J. QUITANS-JR, L.R. BONJARDIM, A.A.S. ARAÚJO "Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing", *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011, pp. 1-9, 2011.
- [36] S.M. BAUER, R.J. BAUER, O.C. VELAZQUEZ, "Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds", *Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 39, n. 4, pp. 293-306, 2005.
- [37] A.D. SEZER, E. CEVHER, F. HATIPOGLU, Z. OGURTAN, A.L. BAS, J. AKBUGA "The use of fucosphere in the treatment of dermal burns in rabbits", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 69, pp. 189-198, 2008.
- [38] E.E. PEACOCK JR, Wound healing and wound care, in S.I. Schwartz (Ed), *Principles of Surgery*, fourth ed., Mcgraw-Hill, Singapore, pp. 292, 1985.
- [39] P.L. WILLIAMS, L.H. BANNISTER, M.N. BERRY, P. COLLINS, M. DYSON, J.E. DUSSEK, M.W.J. FERGUSON, "Gray's anatomy", Churchill-Livingstone, pp.412-417, 1995.
- [40] J. LI, J. CHEN, R. KIRSNER, "Pathophysiology of acute wound healing", *Clinics in Dermatology*, vol. 25, pp. 9-18, 2007.

- [41] A.D. SEZER, F. HATIPOGLU, E. CEVHER, Z. OGURTAN, A.L. BAS, J. AKBUGA “Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro / in vivo evaluation” *AAPS PharmSciTech*, vol. 8, n. 2, 2007.
- [42] A.M.S. ASSREUY, N.M.N. ALENCAR, B.S. CAVADA, D.R. ROCHA-FILHO, R.F. FEITOSA, F.Q. CUNHA, J.J. CALVETE, R.A. RIBEIRO, “Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells”, *Biology of Reproduction*, vol. 68, pp. 1836–1841, 2003.
- [43] V.B.M. ALENCAR, M.N.N. ALENCAR, A.M.S. ASSREUY, M.L. MOTA, G.A. BRITO, K.S. ARAGÃO, F.S. BITTENCOURT, V.P. PINTO, H. DEBRAY, R.A. RIBEIRO, B.S. CAVADA, “Pro- inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 37, pp. 1805–1814, 2005.
- [44] A.M. SELL, C.P. COSTA, “Effects of plant lectins on in vitro fibroblast proliferation”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 46, pp. 349–354, 2003.
- [45] S. CHOI, M. H. CHUNG, “A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects”, *Seminars in Integrative Medicine*, vol. 1, pp. 53–62, 2003.
- [46] A.M. SELL, C.P. COSTA, “Efeito inflamatório local induzido pelas lectinas PHA, WGA e Jacalina”, *Arquivos de Ciências da Saúde*, vol. 6, 47–51, 2002.

5. CONCLUSÕES

A formulação proposta (gel carbopol) manteve a atividade hemaglutinante da Cramoll-1,4, assim como em algumas concentrações teve um papel de proteção impedindo a inativação da lectina sob o efeito da radiação.

A irradiação com raios gama pode ser empregada no controle microbiológico de formulações contendo a Cramoll-1,4 como princípio ativo.

A radiomarcagem da Cramoll-1,4 mostrou que esta lectina é absorvida pelo intestino, processada pelo fígado e excretada pelos rins e não ultrapassa a barreira hematoencefálica. Ela também mostrou que a técnica nuclear pode ser muito útil para o desenvolvimento de drogas e medicamentos.

Neste sentido podemos dizer que a formulação em gel irradiado da Cramoll-1,4 representa um novo biofármaco que pode ser empregado em protocolos de reparação tecidual e que seu efeito está na dependência direta do tipo de tecido em estudo, o que revela o potencial desse gel no contínuo processo de investigação científica.

É importante ressaltar que existe um potencial imenso de pesquisas a serem realizados a partir deste estudo, sinalizando uma gama de possibilidades que venham a contribuir com os avanços no emprego deste novo biofármaco.

6. ANEXOS

Assunto:[RBFAR] Submission Acknowledgement
Data:Mon, 16 Jan 2012 12:09:33 -0200
De:Revista Brasileira de Farmacognosia <suporte.aplicacao@scielo.org>
Responder a:Dr Ralph Santos-Oliveira <roliveira@ien.gov.br>
Para:Dr Ralph Santos-Oliveira <roliveira@ien.gov.br>

Dr Ralph Santos-Oliveira:

Thank you for submitting the manuscript, "RBFAR-1328 - In vitro Evaluation of Gamma Irradiation on a gel formulation of *Cratylia mollis*: Rheological properties and microbiological control" to Revista Brasileira de Farmacognosia. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL:

<http://submission.scielo.br/index.php/rbfar/author/submission/79325>

Username: ralphsantos

If you have any queries, please do not hesitate to contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Revista Brasileira de Farmacognosia
Revista Brasileira de Farmacognosia



CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA

SOCIEDADE BRASILEIRA
DE BIOTECNOLOGIA

Fortaleza - CE - 12 a 15 de outubro de 2010

Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação

CERTIFICADO

A Comissão Científica do 3º. Congresso Brasileiro de Biotecnologia declara que o trabalho intitulado "IN VITRO EVALUATION OF THE INFLUENCE OF GAMMA RADIATION IN A GEL FORMULATION CONTAINING *CRATYLIA MOLLIS* LECTIN" autoria de **Maria Helena Madruga Lima-Ribeiro** foi apresentado no 3º. Congresso Brasileiro de Biotecnologia, realizado no período de 12 a 15 de Outubro de 2010, em Fortaleza-CE.

Maria Fatima Grossi de Sá
Presidente da SBBIotec



SOCIEDADE BRASILEIRA
DE BIOTECNOLOGIA

Maria Sueli Soares Felipe
Secretária da SBBIotec

Research Article

Radiolabeling of Cramoll 1,4: Evaluation of the Biodistribution

Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio,¹ Maria Helena Madruga Lima-Ribeiro,²
Maria Tereza dos Santos Correia,³ Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão,³
Marta de Souza Albernaz,¹ Thiago Barboza,¹ Sergio Augusto Lopes de Souza,⁴
and Ralph Santos-Oliveira¹

¹Laboratory of Nanoradiopharmaceuticals, Academical Hospital Clementino Fraga Filho, 21941-913 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Department of Morphological and Biochemical Analysis, Rural University of Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil

³Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil

⁴Departamento de Radiologia, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho Laboratório de Marcação de Células e Moléculas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-901 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence should be addressed to Ralph Santos-Oliveira, uffista@gmail.com

Received 11 November 2010; Accepted 4 April 2011

Academic Editor: Tzi-Bunb Ng

Copyright © 2011 Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio 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.

The cramoll 1,4 is a well-studied lectin. However, few studies about its biodistribution have been done before. In this study, we radiolabeled the cramoll 1,4 with Tc-99m and analyzed the biodistribution. The results showed that the cramoll has an abnormal uptake by the bowel with reflections on its clearance mechanism.

1. Introduction

Lectins are proteins frequently found in cellular surfaces or in intracellular particles [1]. They possess binding sites specific to carbohydrates and have the capacity to interact with molecules of biological fluids and those present in cellular surfaces [2]. Lectins can substitute natural linkers and activate cellular responses through different roads of intracellular signalling or endocytosis of formed compounds [3, 4]. The therapeutic use of lectins in wound healing process is still scarcely studied.

Camaratu or camaratuba bean (*Cratylia mollis*) is forage of the Northeast Semi-Arid Region from Brazil. Molecular forms of *C. mollis* seed lectin (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3, and Cramoll 4) have been highly purified and characterized (de Souza et al., 2003) [2, 5]. Cramoll 1, Cramoll 2, and Cramoll 4 specifically bind glucose/mannose, while Cramoll 3 is a galactose-specific glycoprotein. Preparations containing isoforms (Cramoll 1,4) and isolectins (Cramoll 1,2,3), as well as Cramoll 1, have been studied in structural analyses and for the most several biotechnological applications (de Souza et al., 2003) [6–12].

The use of nuclear technique for the evaluation of biomolecules and medicines although old is not widely used even nowadays. Since the discovery of the element Technetium, in 1947, it has been used for many purposes. Among the various uses, the labeling process for molecules is the most well established. Scintigraphy imaging provides a dimensional method for exactly locating gamma emitters in a noninvasive procedure under in vivo conditions. For the characterization of drugs, and biomolecules, molecular imaging techniques are extremely helpful to follow biodistribution in experimental animal studies [13]. In this study, the isolectins Cramoll 1,4 were radiolabeled with Tc-99m for the evaluation of the biodistribution and in order to forecast a possible use as radiopharmaceutical in healing process.

2. Methods

2.1. Chromatography. The labeling processes were made using 150 μ L of cramoll (isoform 1,4) solution incubated with stannous chloride (SnCl_2) solutions (80 μ L/mL) (Sigma-Aldrich) for 20 minutes at room temperature. Then, this

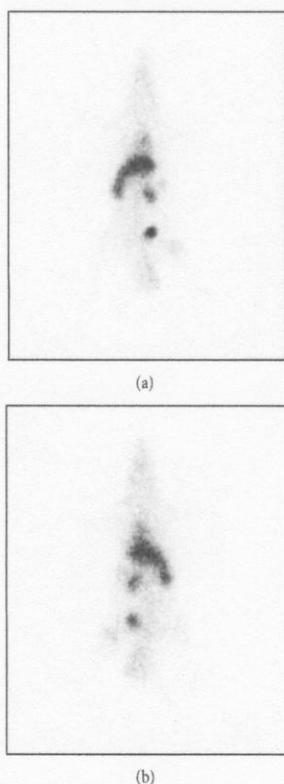


FIGURE 1: Biodistribution of cramol in rats.

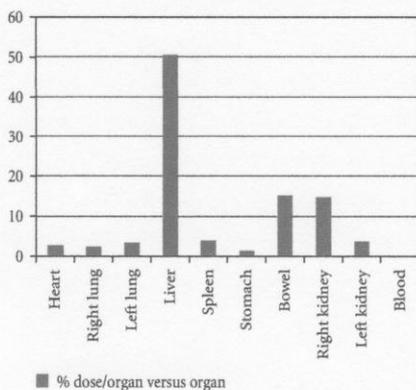


FIGURE 2: Biodistribution %dose/organ versus organ.

solution was incubated with 100 μ Ci (approximately 300 μ L) of technetium-99m (IPEN/CNEN) for other 10 minutes in order to label the cramol 1,4 (here just called cramol) with Tc-99m.

In order to characterize the labeled cramol, thin-layer chromatography (TLC) was made using paper Whatman

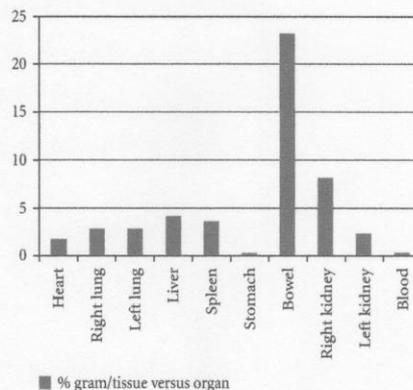


FIGURE 3: Biodistribution %gram/tissue versus organ.

TABLE 1: Ascending chromatographs of the 99m Tc-cramol comparing to free pertechnetate ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$).

	Solvent	Bottom (%)	Top (%)
$^{99m}\text{Tc-cramol}$	Acetone	89.4	10.6
$\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$	Acetone	0.3	99.7

no. 1. The TLC was performed using 2 μ L of a labeled sample in acetone (Proquimios) as a mobile phase. The radioactivity of the strips was verified in a gamma counter (Packard, Cobra II) as described in Table 1.

2.2. *Biodistribution.* The biodistribution was made using one male Wistar rat. In this direction, the Institutional Review Board and the Animal Ethics Committee approved the study protocol for this study. The labeled samples (3,7 MBq/0,2 mL) were administered after the catheterization of the jugular vein. Planar images were obtained 1 hour after injection at a Millennium Gamma Camera (GE Healthcare, Cleveland, USA). Counts were acquired for 5 min in a 15% window centered at 140 KeV (Figure 1). Then, animals were sacrificed, their were organs removed and weighted, and the radioactivity uptake was counted in a gamma counter (Packard-Cobra II). Results were expressed as the percentage of injected dose per organ and percent of injected dose per gram of tissue (Table 2, Figures 2 and 3).

3. Results and Discussion

3.1. *Whatman no. 1 Chromatography.* Results are shown in Table 1.

In this case, the results showed that the acetone can be used for this purpose. In a triplicate test, all the results were very close. The free pertechnetate was eluted to the top of the chromatograms, and the cramol stayed in the bottom. Moreover, the results observed in the chromatogram elucidated the question about the efficacy of the labeling process, corroborating that the cramol was efficiently labeled with Tc-99m.

TABLE 2: Biodistribution of the labeled samples in rat.

Organs	%dose/organ	%gram/tissue
Heart	2,98	1,78
Right lung	2,65	2,93
Left lung	3,58	2,88
Liver	50,82	4,17
Spleen	4,28	3,69
Stomach	1,44	0,38
Intestine	15,38	23,30
Right kidney	14,83	8,23
Left kidney	3,77	2,35
Blood	0,27	0,27

3.2. *Biodistribution Studies.* The results of the labeled sample are as shown below.

^{99m}Tc -Cramol scintigraphy 1 h after injection shows liver, kidneys, and bladder. A: anterior view. B: posterior view.

As we can see, the great part of the lectin was processed by the liver. This is absolutely normal especially for injectable drugs, since almost all the drugs are first processed by the hepatic system (Figure 2). Otherwise, when dissecting, weighing and counting the organs, a suspicious data appeared. Figure 3 showed an abnormal accumulation of the lectin in the bowel. As a protein, we were expecting that its clearance would be made by the kidney, and in fact, it occurred. However, the rate between the bowel and the kidney is over the double. In this case, the clearance time would be reduced and the reabsorption of the drug could be facilitated by the microvilli of the bowel. In this case a dosage error could occur or even a toxic reaction due its accumulation in the bowel. In both cases, further studies should be made to clarify this mechanism and the relevance of that information in a developed drug based on lectin similar to the cramol 1,4. It is interesting to notice, analyzing both Figures 1 and 2, that the lectin cannot pass the hematoencephalic barrier. And in this case, the lectin does not represent a risk for the brain function.

4. Conclusion

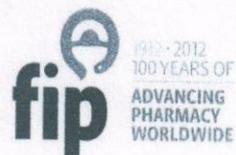
The radiolabeling of the cramol showed that this lectin has an uncommon behavior specially related to the clearance mechanism that we believe must be more studied. It also showed that the nuclear technique can be very helpful for the development of drugs and medicines. The results help to elucidate that the lectin cannot cross the hematoencephalic barrier.

Acknowledgments

This research was supported by the FAPERJ, CNPq, and UFPE.

References

- [1] N. Sharon and H. Lis, "A century of lectin research (1888–1988)," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 12, pp. 488–491, 1985.
- [2] M. T. S. Correia and L. C. B. B. Coelho, "Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean)," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 55, no. 3, pp. 261–273, 1995.
- [3] M. Hong, A. Cassely, Y. Mechref, and M. V. Novotny, "Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis," *Journal of Chromatography*, vol. 752, no. 2, pp. 207–216, 2001.
- [4] J. Beuth, H. L. Ko, G. Pulverer, G. Uhlenbruck, and H. Pichlmaier, "Importance of lectins for the prevention of bacterial infections and cancer metastases," *Glycoconjugate Journal*, vol. 12, no. 1, pp. 1–6, 1995.
- [5] P. M. G. Paiva and L. C. B. B. Coelho, "Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (camaratu bean)," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 36, no. 2, pp. 113–118, 1992.
- [6] R. Angeli, N. V. da Paz, J. C. Maciel et al., "Ferromagnetic levan composite: an affinity matrix to purify lectin," *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, vol. 2009, Article ID 179106, 2009.
- [7] M. D. L. de Oliveira, "Estudo bioeletroquímico de nanosistemas híbridos de nanopartículas de ouro e lectinas para o desenvolvimento de sensores," 174 f. tese de doutorado—curso de pós-graduação em química—centro de ciências exatas e da natureza, universidade federal de pernambuco, 2008.
- [8] C. A. S. Andrade, M. T. S. Correia, L. C. B. B. Coelho, S. C. Nascimento, and N. S. Santos-Magalhães, "Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 278, no. 2, pp. 435–445, 2004.
- [9] E. V. M. Maciel, V. S. Aratijo-Filho, M. Nakazawa, Y. M. Gomes, L. C. B. B. Coelho, and M. T. S. Correia, "Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes," *Biologicals*, vol. 32, no. 1, pp. 57–60, 2004.
- [10] P. M. G. Paiva, A. F. Souza, M. L. V. Oliva et al., "Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins," *Bioresource Technology*, vol. 88, no. 1, pp. 75–79, 2003.
- [11] E. I. Beltrão, M. T. Correia, J. Figueiredo-Silva, and L. C. Coelho, "Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to mammary human tissues," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 74, pp. 125–134, 1998.
- [12] V. L. M. Lima, M. T. S. Correia, Y. M. N. Cechinel, C. A. M. Sampaio, J. S. Owen, and L. C. B. B. Coelho, "Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase," *Carbohydrate Polymers*, vol. 33, pp. 27–32, 1997.
- [13] O. M. Merkel, D. Librizzi, A. Pfestroff, T. Schurrat, M. Béhé, and T. Kissel, "In vivo spect and real-time gamma camera imaging of biodistribution and pharmacokinetics of siRNA delivery using an optimized radiolabeling and purification procedure," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 20, no. 1, pp. 174–182, 2009.



Certificate

This is to certify that the abstract

"RADIOLABELING OF CRAMOL 1,4"

from the following author(s)

Ralph Santos-Oliveira¹, Maria Helena Lima-Ribeiro², Maria Tereza Correia²,
Cameiro-Leão Ana Maria², SERGIO Souza³, BARBOZA THIAGO¹, Albemaz
Marta¹

¹Laboratory of Nanoradiopharmaceutical, RIO DE JANEIRO, Brazil

²Federal University of Pernambuco, RECIFE, Brazil

³Federal University of Rio de Janeiro, RIO DE JANEIRO, Brazil

was presented as Poster presentation at the

71st International Congress of FIP
'Compromising safety and quality: a risky path'

in Hyderabad, India, 3 – 8 September 2011

On behalf of the organisers,

Gretie Rolf von den Baumen
FIP Congress Director
Hyderabad, September 2011

NUP-P-03
Nuclear Pharmacy Posters

Fédération
Internationale
Pharmaceutique

International
Pharmaceutical
Federation

Andries Bickerweg 5
PO. Box 84200
2508 AE The Hague
The Netherlands
T +31 (0)70 302 19 70
F +31 (0)70 302 19 95
fip@fip.org
www.fip.org



Pharmaceutical
Federation

Assunto:Submission Confirmation

Data:13 Jan 2012 15:10:07 +0000

De:BONE (ELS) <bone@elsevier.com>

Para:roliveira@ien.gov.br

Dear Dr Ralph Santos-Oliveira,

Your submission entitled "Evaluating the effectiveness of the gel formulation of the irradiated seed lectin *Cratylia mollis* in the process of bone repair in rats" has been received by Bone

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/bone/>.

If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/bone/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Editorial Office
Bone

460841: Acknowledging Receipt

De: Journal of Biomedicine and Biotechnology ✉

Dear Ms. Pereira,

The Methodology Report titled "DEVELOPMENT OF ANIMAL MODEL FOR STUDYING DEEP SECOND-DEGREE THERMAL BURNS," by Danielle Pereira, Maria Helena Lima-Ribeiro, Nicodemos Pontes-Filho, Ana Maria Carneiro-Leão and Maria Tereza Correia has been received and assigned the number 460841.

The special issue for which the paper is being processed is "Animal Models of Human Pathology 2012"

An editor will be assigned to handle the review process of your manuscript, and he/she will inform you as soon as a decision is reached.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript. However, only the submitting author will be able to upload any revisions to the journal's Manuscript Tracking System.

Thank you for submitting your work to Journal of Biomedicine and Biotechnology.

Best regards,

Hend Salah
Editorial Office
Hindawi Publishing Corporation
<http://www.hindawi.com>