



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - PPGCBM**

DIÊGO PASSOS ARAGÃO

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE FRAÇÕES
PROTEICAS DE SEMENTES DE *Crotalaria retusa***

**PARNAÍBA – PI
FEVEREIRO – 2016**

DIÊGO PASSOS ARAGÃO

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE FRAÇÕES
PROTEICAS DE SEMENTES DE *Crotalaria retusa*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas – PPGCBM, da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas

Área de Concentração: Novas Tecnologias e Metodologias de Diagnóstico e Tratamento.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira

PARNAÍBA – PI
FEVEREIRO – 2016

DIÊGO PASSOS ARAGÃO

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE FRAÇÕES
PROTEICAS DE SEMENTES DE *Crotalaria retusa*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas – PPGCBM, da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas

APROVADA EM 29/02/2016

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira
Departamento de Biomedicina
Universidade Federal do Piauí
PRESIDENTE

Prof. Dr. Cláudio Ângelo Ventura
Departamento de Biomedicina
Universidade Federal do Piauí
MEMBRO

Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho
Departamento de Medicina
Universidade Federal do Piauí
MEMBRO

Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira
Departamento de Biomedicina
(Orientador)

PARNAÍBA – PI
FEVEREIRO – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

A659a Aragão, Diêgo Passos.

Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de frações proteicas de sementes de *Crotalaria retusa* [manuscrito] / Diêgo Passos Aragão. – 2016. 62 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira.

1. Plantas. 2. Sementes de *Crotalaria retusa*. 3. Atividade Anti-inflamatória. 4. Atividade Antinociceptiva. I. Título.

CDD: 615,321

EPÍGRAFE

"Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."

Dalai Lama

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais,
Josefa Aragão Passo e
Clarismundo Alves Aragão Neto.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pelo dom da vida e sabedoria;

Ao meu orientador, **prof. Dr Jefferson Soares de Oliveira**, por todo o ensinamento, apoio, enriquecimento científico, crítico e profissional, paciência, dedicação nas orientações e amizade. Exemplo de profissional ético, dedicado e humilde. Agradeço muito tudo o que me ensinastes;

Ao **prof. Dr. Jand-Venes Medeiros Rolim**, pela disponibilidade do laboratório **LAFFEX** para a realização dos experimentos;

Ao **prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos**, pelas enriquecedoras sugestões, e correções realizadas no meu projeto de qualificação;

Ao **prof. Dr. Cláudio Ângelo Ventura**, pelas sugestões e correções realizadas no meu projeto de qualificação, e novamente, por ter aceitado o convite de fazer parte da banca examinadora desta dissertação;

Ao **prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho**, por ter aceitado o convite de fazer parte da banca examinadora desta dissertação e pelas valiosas considerações;

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas** e todos os Professores deste, pelo enriquecimento científico, crítico e profissional;

Aos amigos de laboratório, **Lucas, Bruna, Renata, Patrícia, Lucas Eduardo e Douglas**, pela ajuda e disposição nas longas horas de realização dos experimentos, principalmente ao Lucas por toda a ajuda e amizade no decorrer do curso;

Aos amigos e colegas, **Tarcísio, Thiago, Nayara, Luan** e todos aqueles que ajudaram na realização dos experimentos;

Ao **BIOMIC**, laboratório onde realizei grande parte dos experimentos, e aos demais laboratórios de pesquisa, pelos equipamentos e estrutura que me permitiram a realização deste trabalho;

Aos **amigos e colegas de mestrado**, pela amizade e enriquecimento profissional durante todo o curso;

Ao **Conselho de Apoio à Pesquisa (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI)**, pelo financiamento que gerou esse trabalho;

A minha namorada, **Raquel Mágda**, por toda a ajuda, companheirismo e paciência no decorrer do curso;

Aos meus **familiares**, pelo incentivo no decorrer de minha vida acadêmica;

Aos meus irmãos: **Tiago e Cleidiane** pelo incentivo durante minha vida acadêmica;

Aos meus pais, **Josefa Aragão Passo e Clarismundo Alves Aragão Neto** por tudo o que vocês fizeram durante minha vida, ter proporcionado uma boa educação, e empenho para que eu pudesse crescer na vida através dos estudos, sem vocês não chegaria onde cheguei, muito obrigado por tudo;

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DAS PLANTAS	3
2.1.1 Proteínas: suas funções na planta	4
2.1.2 Sementes e seus constituintes	5
2.1.3 Sementes: ação anti-inflamatória e antinociceptiva	6
2.2 O GÊNERO CROTALARIA E A ESPÉCIE <i>Crotalaria retusa</i>	8
2.3 FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO	9
2.3.1 Alterações vasculares durante a inflamação.....	11
2.3.2 Células envolvidas na resposta inflamatória	12
2.3.3 Mediadores inflamatórios	14
2.4 FISIOPATOLOGIA DA DOR	17
3. OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 DROGAS E REAGENTES	21
4.2 COLETA E FRACIONAMENTO DA FARINHA DE SEMENTES DE <i>Crotalaria retusa</i>	21
4.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	22
4.3.1 Eletroforeses em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE)	22
4.3.2 Cromatografia de afinidade em coluna de guar gum	22
4.3.3 Determinação da presença de lectinas através de ensaio de atividade hemaglutinante.....	23
4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS	23
4.4.1 Edema de pata induzido por carragenina	24

4.4.2 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	24
4.4.3 Edema de pata induzido por dextrana	25
4.4.4 Peritonite induzida por carragenina	25
4.4.5 Contorções abdominais induzidas por ácido acético	26
4.4.6 Teste de formalina	26
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5. RESULTADOS	28
5.1 Análise do perfil proteico das frações Alb e G1b.....	28
5.2 Potencial anti-inflamatório	28
5.2.1 Edema de pata induzido por carragenina	28
5.2.2 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	30
5.2.3. Edema de pata induzido por dextrana	30
5.2.4 Peritonite induzida por carragenina	31
5.4 Potencial antinociceptivo	32
5.4.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético	32
5.4.2 Teste da formalina	33
5.4 Atividade hemaglutinante.....	34
5.2 Cromatografia em coluna de guar gum.....	35
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÃO.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alb:	Albuminas
ANOVA:	Análise de variância
Cg:	Carragenina
Indo:	Indomatacina
Dx:	Dextrana
E.P.M.:	Erro padrão da média
Glb:	Globulinas
i.p.:	Intraperitoneal
i.s:	Injeção subplantar
MPO:	Mieloperoxidase
s.c.:	Subcutânea
SDS:	Sulfato dodecil de sódio
UMPO:	Unidades de Mieloperoxidase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Foto das sementes de <i>Crotalaria retusa</i>	9
Figura 2.	Alterações celulares e vasculares na inflamação aguda	11
Figura 3.	Migração leucocitária ao sítio inflamado	13
Figura 4.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%).....	28
Figura 5.	Efeito inibitório da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)..	30
Figura 6.	Efeito anti-inflamatório no modelo de edema de pata induzido por dextrana	31
Figura 7.	Efeito anti-inflamatório no modelo de peritonite induzida por carragenina	32
Figura 8.	Efeito antinociceptivo no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	33
Figura 9.	Efeito antinociceptivo no modelo de formalina.....	34
Figura 10.	Cromatografia em coluna de guar gum.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Algumas sementes utilizadas na medicina popular	6
Tabela 2.	Atividade anti-inflamatória das frações proteicas de sementes de <i>Crotalaria retusa</i> em edema de pata induzido por carragenina	29
Tabela 3.	Atividade hemaglutinante ($\mu\text{gP/UA}$) das frações proteicas de sementes de <i>Crotalaria retusa</i>	35

RESUMO

Título: ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE FRAÇÕES PROTEICAS DE SEMENTES DE *Crotalaria retusa*

As plantas são fontes importantes de compostos com ações farmacológicas. Estudos relatam que proteínas advindas de sementes podem ter ações terapêuticas relevantes como, antifúngica, antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptiva e anticancerígena. Diante deste potencial, o presente estudo teve como objetivo avaliar as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de frações proteicas obtidas a partir de sementes de *Crotalaria retusa*. As sementes de *C. retusa* foram coletadas na cidade de Parnaíba-PI e trituradas para formação de uma farinha de fina granulação, ao qual foi submetida a fracionamento segundo o método de Osborne. Eletroforese SDS-PAGE foi realizada para caracterização do perfil proteico das frações Albumina (Alb) e Globulina (Glb). Foi conduzido o teste de hemaglutinação para investigação da presença de lectinas. Foi utilizada cromatografia por afinidade em coluna de guar gum na tentativa de purificação de lectina presente nas frações. A atividade anti-inflamatória das frações foram avaliadas pelos métodos de edema de pata (induzido por carragenina e dextrana), quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e peritonite induzida por carragenina. A atividade antinociceptiva foi avaliada por testes de estímulo químico (contorções abdominais induzidas por ácido acético e formalina). Camundongos Swiss fêmeas (*Mus musculus*) pesando entre 25 – 28g (n = 6) foram utilizados na realização de todos os ensaios. Estes seguiram as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e os resultados expressos como média ± erro padrão (ANOVA - Newman-Kleus; p < 0,05). A análise do perfil eletroforético mostrou que as frações Alb e Glb possuem pelos menos quatro bandas com peso molecular entre 21,1 a 64,0 Kda. Os resultados mostram que as frações Alb e Glb (5, 10 e 20mg/kg) administradas por via intraperitoneal (i.p.) foram capazes de reduzir a formação do edema de pata induzido por carragenina a partir da 2ª h do ensaio, sendo a dose de 20mg/kg de ambas com o melhor percentual de redução do edema a partir da 3ª e 4ª h, indicando que elas possam atuar inibindo a migração leucocitária. Fato este corroborado e reforçado com os dados da quantificação da enzima MPO e peritonite. A dose de 20mg/kg (Alb e Glb) reduziu significativamente a quantificação da atividade da MPO no foco inflamatório, bem como, a contagem total e diferencial de leucócitos, principalmente neutrófilos. Quanto ao potencial antinociceptivo, a fração Glb (20mg/kg) reduzir a frequência de contorções induzidas por ácido acético (0,6%) em 83,46% em comparação ao grupo controle, no ensaio de formalina, ambas as frações foram capazes de reduzir o tempo que os camundongos permaneceram lambendo/mordendo suas patas (2ª fase do evento), sugerindo que sua ação não esteja associada com mecanismos centrais. Além disso, as frações mostraram atividade hemaglutinante contra todos os eritrócitos do sistema ABO, indicando a presença de lectinas nas frações. Análise do perfil cromatográfico mostra picos em ambas as frações, sugerindo a presença de lectinas, assim, justificando, as atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas das frações Alb e Glb extraídas de sementes de *Crotalaria retusa*.

Palavras chave: Compostos bioativos, potencial terapêutico, proteínas vegetais

ABSTRACT

Title: ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF PROTEIN FRACTION OF *Crotalaria retusa* SEEDS

Plants are important sources of compounds with pharmacological actions. Studies report that proteins obtained seeds can have significant therapeutic actions as antifungal, antimicrobial, anti-inflammatory, antinociceptive and anti-cancer. Given this potential, the present study aimed to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive activities of protein fractions obtained from *Crotalaria retusa* seeds. The *C. retusa* seeds were collected in Parnaíba-PI and crushed to form a fine-grained flour, which has been subjected to fractionation according to Osborne method. SDS-PAGE was performed to characterize the protein profile of the fractions Albumin (Alb) and Globulin (Glb). We conducted the hemagglutination test to investigate the presence of lectins. It was used affinity chromatography in guar gum column for purification of lectin present in the fractions. The anti-inflammatory activity of the fractions were evaluated by paw edema methods (induced by carrageenin and dextran) quantifying the activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO) and carrageenan-induced peritonitis. The antinociceptive activity was evaluated by chemical stimulation test (writhing induced by acetic acid and formalin). Swiss females mice (*Mus musculus*) weighing between 25-28 g (n = 6) were used in the realization of all tests. These followed the Brazilian College of Animal Experimentation guidelines and the results expressed as mean \pm standard error (ANOVA - Newman-Kleus; p <0.05). The analysis of the electrophoretic profiles showed that Alb and Glb fractions have at least four bands with molecular weights between 21.1 to 64.0 kDa. The results show that Alb and Glb fractions (5, 10 and 20mg/kg) administered intraperitoneally (ip) were able to reduce the formation of paw edema induced by carrageenan from the 2nd h of the test, and the dose of 20mg/kg both with the best reduction percentage of edema from the 3rd and 4th h, indicating that they may act by inhibiting leukocyte migration. This fact is supported and reinforced with the data from the quantification of the enzyme MPO and peritonitis. The dose of 20mg/kg (Alb and Glb) significantly reduced the quantification of MPO activity in the inflammatory site, as well as, the total and differential counts of leukocytes, especially neutrophils. Regarding the antinociceptive potential, Glb fraction (20 mg/kg) to reduce the frequency of writhing induced by acetic acid (0.6%) to 83.46% compared to the control group, in the formalin test, both fractions were able to reduce the time the mice remained licking/biting their paws (2nd phase of the event), suggesting that their action is not associated with central mechanisms. Furthermore, the fractions showed hemagglutinating activity against all of the ABO erythrocytes, indicating the presence of lectins in the fractions. Analysis of the chromatographic profile shows peaks in both fractions, suggesting the presence of lectins, thus explaining the anti-inflammatory and antinociceptive activities of Alb and Glb fractions extracted from *Crotalaria retusa* seeds.

Keywords: Bioactive compounds, therapeutic potential, vegetable proteins

1. INTRODUÇÃO

Dos primórdios da civilização até hoje, os compostos bioativos derivados de plantas, animais, organismos marinhos e microrganismos têm sido utilizados com o intuito de tratamento e prevenção de enfermidades (CHIN et al., 2006; JI et al. 2009; KUMAR et al., 2013b; HARVEY et al., 2015).

Através de avaliações puramente instintivas realizadas ao longo dos séculos, por meio de testes de palatabilidade, busca para alimentação e tratamento de doenças, pode-se observar que as plantas correspondem as principais fontes de moléculas bioativas que podem ser empregadas na terapêutica, formando a base para o desenvolvimento de medicamentos (BRANDÃO et al., 2010; DIAS et al., 2012; PETROVSKA, 2012; CRAGG; NEWMAN, 2013).

Os compostos biologicamente ativos e seus derivados, são amplamente utilizados como matérias-primas e/ou modelos para o desenvolvimento de possíveis fármacos, graças a sua diversidade estrutural química. Em determinadas patologias mais de 60,0% dos medicamentos utilizados no tratamento são provenientes de origem natural (CHIN et al., 2006; FOGGIO, 2006; MOLINARI, 2009; COSTA-LOTUFO et al., 2010; PIMPOLHO, 2013).

O Brasil é detentor da maior biodiversidade mundial (SACARRO JUNIOR, 2011) com cerca de 15,0 a 25,0% da diversidade biológica vegetal, ao qual impulsiona a pesquisa científica e a bioprospecção em busca de novas moléculas bioativas (DE SOUZA et al., 2013).

Pesquisas fitoquímicas têm demonstrado que compostos bioativos oriundos de diversas partes das plantas, inclusive das sementes, são capazes de causar efeitos farmacológicos relevantes (MOLINARI, 2009; BERNHOFT, 2010; BESSA et al., 2013; FULDA; EFFERTH, 2015).

A composição química de sementes, abrange desde nutrientes fundamentais para alimentação humana e animal (SASAKI, 2008), até compostos tóxicos e antinutricionais, utilizados como mecanismo de defesa contra a sua predação (TEGEDER; WEBER, 2006; HONÓRIO JÚNIOR et al., 2010; OLOLADE et al., 2013). Além do mais, é comum na medicina popular o uso de sementes de certas espécies para o tratamento de diversas patologias,

no entanto, algumas sem validação científica quanto à sua segurança e potencial terapêutico (HOLETZ et al., 2002; SOBRINHO, 2011; MOREIRA, 2013).

A *Crotalaria retusa*, apresenta escassa avaliação científica em relação as suas propriedades fármaco-terapêutica. Assim, a semente da *C. retusa* foi alvo de fracionamento para estudos de caracterização bioquímica de proteínas, onde esses dados podem fornecer informações importantes sobre o seu possível potencial anti-inflamatório, antinociceptivo e terapêutico.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DAS PLANTAS

É crescente o número de pesquisas utilizando plantas, organismos marinhos e microrganismos em busca de biomoléculas com possível potencial terapêutico (COSTA-LOTUFO et al., 2010; MISHRA; TIWARI, 2011; PEREIRA; CARDOSO, 2012; SUAREZ-JIMENEZ et al., 2012; VALLI et al., 2012). Estes estudos relatam que elas apresentam atividades farmacológicas significantes, podendo regular várias vias de sinalização celular, desde vias antimitótica, anti-inflamatória, anti-infecciosa, até anti-angiogênica (SUAREZ-JIMENEZ et al., 2012; RAMANA et al., 2014).

As plantas além de fazerem parte da alimentação humana, também são fontes importantes de muitos compostos biologicamente ativos com ações farmacológicas consideráveis, formando a base de intervenções terapêuticas ao longo da história humana (PAN et al., 2010; DEVENDRA et al., 2012; TALAVIYA et al., 2014). Registros encontrados em placas de argila em Nagpur (aproximadamente 5.000 a.C.) mostram 12 receitas para a preparação de medicamentos empregando mais de 250 plantas, e na Mesopotâmia a utilização de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), mirra (*Commiphora species*) e o látex da papoula (*Papaver somniferum*) (cerca de 2.600 a.C.). Estes podem ser os primeiros relatos escritos do uso de plantas na terapêutica (CHIN, 2006; PETROVSKA, 2012; CRAGG; NEWMAN, 2013). Nos dias atuais, essas plantas ainda são utilizadas para o tratamento de várias doenças ou como ingrediente de medicamentos oficiais ou preparações herbais (CHIN et al., 2006; VALLI et al., 2012; JI et al., 2009; CRAGG; NEWMAN, 2013).

O Brasil detém a maior diversidade biológica mundial (SACCARO JUNIOR, 2011; BERLINCK, 2012), abrigando por volta de 15,0 a 25,0% da biodiversidade vegetal, além de apresentar uma grande variedade de espécies endêmicas (DE SOUZA et al., 2013). Os produtos bioativos derivados a partir de plantas, possuem ampla diversidade estrutural e atividades biológicas altamente específicas, características úteis para o desenvolvimento de medicamentos, e/ou modelo de fármacos semissintéticos ou sintéticos, ao qual impulsiona a pesquisa

científica e a bioprospecção (CHIN et al., 2006; NOVA, 2012; DE SOUZA, et al., 2013; CRAGG; NEWMAN, 2013; JIMENEZ-GARCIA et al., 2013).

2.1.1 Proteínas: suas funções na planta

As plantas não contam com sistema imune comparado ao de vertebrados e muito menos com um meio de locomoção que as protejam de situações patológicas como ataques de fungos, bactérias, vírus, nematoides, insetos e herbívoros (AUSUBEL, 2005; SELS et al., 2008). No entanto, para garantir a sua sobrevivência, desenvolveram diversos mecanismos de defesa, como características morfológicas e estruturais (expressas ou induzidas), imunidade inata e síntese de compostos químicos (expressos ou induzidos) capazes de reconhecer, sinalizar e mediar uma resposta ao ataque (HUYNH et al., 1992; AUSUBEL, 2005; DE LUCCA et al., 2005; STANGARLIN et al., 2011; VANDENBORRE et al., 2011). Esses produtos químicos presentes em diversas partes das plantas, abrangem compostos de pequeno peso molecular (metabólitos secundários), peptídeos e proteínas (SELITRENNIKOFF, 2001; VANDENBORRE et al., 2011).

Proteínas são moléculas fundamentais à todas as células de um organismo (SASAKI, 2008). Nas plantas podem ser encontradas em diversas partes (folhas, frutos e órgão de estocagem [tubérculos e sementes]) (RADHAKRISHNAN; RANJITHAKUMARI, 2009), atuando em variadas funções, como na homeostase, no crescimento e desenvolvimento (fornecendo carbono, nitrogênio e enxofre), na senescência, como nutriente e no mecanismo de defesa, agindo direta (eliminar o agente agressor) ou indiretamente (manutenção das estruturas e funções celulares) (HERMAN; LARKINS, 1999; MELLO, 2010; PINTO et al., 2011; SALAS et al., 2015).

São exemplos de algumas proteínas e frações proteicas encontradas em plantas: DELLA, albumina, glutenina, globulina, prolaminas, patatinas, tarinas, ocatinas, proteínas *killer*, lectinas, inibidores de proteases serínicas e cisteínicas, polifenoloxidasas (PFO), peroxidases (POX), fenilalanina-amônia-liase (FAL) e as proteínas relacionadas à patogênese (RP) (SELITRENNIKOFF, 2001; FU et al., 2004; MACEDO et al., 2004; ALVEY; HARBERD, 2005; VAN LOON et al.,

2006; DE OLIVEIRA; MACEDO, 2011; PINTO et al., 2011; VANDENBORRE et al., 2011; COSTA, 2012; NEHETE et al., 2013).

Estudos relatam que proteínas vegetais apresentam atividades antifúngica (HUYNH et al., 1992; SELITRENNIKOFF, 2001; DE LUCCA et al., 2005; MELLO, 2010; WONG et al., 2010; VRIENS et al., 2014), antimicrobiana (BARBOSA et al., 2011; AL AKEEL et al., 2014; VRIENS et al., 2014; SALAS et al., 2015), inseticida (VANDENBORRE et al., 2011; WAR et al., 2012; VRIENS et al., 2014), anticarcinogênica (DE MEJÍA; PRISECARU, 2005; BARRIO; AÑÓN, 2010; FERRIZ-MARTINEZ et al., 2010; GUZMÁN-RODRÍGUEZ et al., 2014), anti-inflamatória (LEITE PEREIRA et al., 2011; SCHUSSHEIM et al., 2011; LACERDA et al., 2015) e antinociceptiva (YOSHIKAWA et al., 2003; LEITE PEREIRA et al., 2011; LACERDA et al., 2015). Algumas dessas atividades foram encontradas em sementes, ao qual vem intensificando o interesse de pesquisadores no seu estudo.

2.1.2 Sementes e seus constituintes

A semente trata-se do órgão vegetal responsável pela dispersão e perpetuação das plantas vasculares, contendo o óvulo desenvolvido após a fecundação, possuindo um eixo embrionário em algum estágio de desenvolvimento com ou sem reservas nutritivas e um envoltório protetor (SHEWRY et al., 1995; VIDAL; VIDAL, 2003; COUTINHO, 2006; MORAES, 2007; VIVIAN et al., 2008; JUDD et al., 2009). O endosperma e perisperma são os principais tecidos responsáveis pela nutrição do embrião (COSTA et al., 2011), podendo conter amido, óleos, proteínas e oligossacarídeos (JUDD et al., 2009; BORGES et al., 2010). O tegumento forma o envoltório protetor da semente protegendo o embrião de injúrias mecânicas, perda excessiva de água e condições patológicas (PESKE et al., 2003; SASAKI, 2008; SELS et al., 2008; JUDD et al., 2009; MARCOS-FILHO, 2013).

Elas são fontes nutricionais importantes de carboidratos, lipídios, vitaminas, proteínas, estas correspondem geralmente de 20 a 30% do peso seco em leguminosas, e minerais (LABOURIAU, 1990; SASAKI, 2008; CHEVREUIL et al., 2009; FREITAS; NAVES, 2010), além de conter outras substâncias como antioxidantes naturais e compostos secundários, tóxicos ou antinutricionais

(SALES et al., 2000; SASAKI, 2008; SANDOVAL-OLIVEROS; PAREDES-LÓPEZ, 2012).

As sementes são constituídas por proteínas de todos os tipos durante o seu desenvolvimento, exercendo diversos papéis, como estrutural, reserva nutricional, envolvidas com o mecanismo de proteção e processos fisiológicos, podendo algumas destas funções se sobrepor (SHEWRY et al., 1995; VASCONCELOS et al., 2004; COSTA, 2012).

As frações proteicas de sementes podem ser separadas em albumina, globulina, glutelina e prolamina de acordo com sua solubilidade em água deionizada, NaOH, HCl e etanol 70% respectivamente (OSBORNE, 1924; SHEWRY et al., 1995; SALES et al., 2000; PESKE et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2004; PINTO et al., 2005; COSTA, 2012).

2.1.3 Sementes: ação anti-inflamatória e antinociceptiva

A utilização de sementes é uma prática comum na medicina popular. O conhecimento sobre o uso de plantas medicinais e de suas partes (cascas, sementes, frutas e dentre outras) acompanha o homem desde os primórdios da civilização (SALEM, 2005; FRANCO; BARROS, 2006; PETROVSKA, 2012; AHMAD et al., 2013).

Através de alguns levantamentos etnobotânicos, a Tabela 1 exemplifica algumas sementes e seu uso na medicina popular brasileira (HOLETZ et al., 2002; FENNER et al., 2006; MOREIRA, 2013; SOBRINHO et al., 2011).

Tabela 1. Algumas sementes utilizadas na medicina popular

Espécies	Uso popular	Referências
<i>Mangifera indica</i> L	Leucorreia	
<i>Carica papaya</i> L	Úlcera	
<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link	Micoses, feridas, impingem, pano-branco	Fenner et al., 2006
<i>Persea americana</i> Mill	Ácido úrico, prevenir queda de cabelo, anticaspa	
<i>Bixa orellana</i>	Males de fígado, tuberculose, antipirético e anti-inflamatório, antídoto para o ácido prússico	Moreira, 2013
<i>Jatropha curcas</i> L.	Abstinência de álcool, acidente vascular cerebral, dor de cabeça	Sobrinho et al., 2011

Continuação Tabela 1.

<i>J. gossypifolia</i> L.	Constipação, depurativo, inflamação em geral	Sobrinho et al., 2011
<i>J. molíssima</i> (Pohl) Bail.	Cicatrizante, dor de dente, gastrite, inflamação renal	
<i>Ricinus communis</i> L.	Alopecia, constipação, dor em geral	Holetz et al., 2002
<i>Tanacetum vulgare</i> L.	Anti-inflamatório e infecções hemintícas	
<i>Plantago major</i> L.	Antisséptico, anti-inflamatório	

Estudos apontam que proteínas encontradas em diversas partes das plantas, inclusive em sementes, apresentam atividades anti-inflamatória e antinociceptiva, como as sementes de *Dioclea violacea*, *D. guianensis*, *Gratylia floribunda* e *Canna Limbata* (ALENCAR et al., 1999; HOLANDA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2013).

Uma lectina isolada de sementes da espécie *Mucuna pruriens* (L) DC. em modelo de dor induzido por ácido acético, apresentou atividade antinociceptiva melhor do que indometacina (anti-inflamatório não esteroide) inibindo a ativação de nociceptores mediados pela secreção de prostaglandina, além de reduzir significativamente o edema induzido por carragenina (LACERDA et al., 2015).

Em um teste utilizando ácido acético para induzir contorções e inflamação, uma proteína ligante à quitina obtida de sementes de *Moringa oleifera* mostrou atividade antinociceptiva e anti-inflamatória semelhante a indometacina, além de diminuir a formação do edema pela redução da permeabilidade capilar (LEITE PEREIRA et al., 2011).

Uma lectina isolada a partir da semente de *Lonchocarpus arariensis* Benth, foi capaz de diminuir a migração de leucócitos para o local inflamado. Além disso, a atividade hemaglutinante desta lectina não foi significativa (RODRIGUES, 2012).

A lectina de *Canavalia brasiliensis* MART apresentou atividade antinociceptiva quando administrada por via endovenosa ou por via oral, diminuindo o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético e também o número de lambidas no teste de formalina (PIRES et al. 2013).

2.2 O GÊNERO CROTALARIA E A ESPÉCIE *Crotalaria retusa*

A família Fabaceae ou Leguminosae compreende 650 gêneros e cerca de 18.000 espécies com distribuição cosmopolita. Encontrada nos continentes americano, asiático e africano, desde zonas tropicais e subtropicais, próximas a rios, morros litorâneos, restingas, orlas de florestas, campos e cerrados (BARRETO et al., 2006; GARCIA et al., 2013; SILVA-LÓPEZ; PACHECO, 2013; RAHMAN; PARVIN, 2014). Corresponde a terceira maior família botânica em números de espécies, abrangendo 9,4% de todas as angiospermas, incluindo árvores, arbustos e plantas herbáceas perenes ou anuais que são facilmente reconhecidas devido ao seu fruto (legume) (SILVA-LÓPEZ; PACHECO, 2013; RAHMAN; PARVIN, 2014).

Assim como a família, o gênero *Crotalaria* L (Fabaceae) é amplamente distribuído em diversas regiões do globo, possuindo mais de 600 espécies, a maioria delas tóxicas para animais e humanos (DA TRINDADE NOBRE et al., 2004; QUEIROZ et al., 2013; SILVA-LÓPEZ; PACHECO, 2013), sendo as mais conhecidas a *C. crispata*, *C. dura*, *C. globifera* e *C. retusa*. A toxicidade é causada pelo o alto teor do alcaloide monocrotalina (alcaloide pirrolizidínico), encontrado em diferentes partes da planta, como folhas novas, ramos de florescência e sementes, atuando como defesa química contra predadores (WILLIAMS; MOLYNEUX, 1987; DA TRINDADE NOBRE et al. 2004; PITANGA, 2008; RAJ et al., 2011; SILVA-LÓPEZ; PACHECO, 2013)

Botanicamente a *C. retusa* é um subarbusto podendo atingir cerca de 1m, apresenta folhas simples oblanceoladas, caule ereto, pouco ramificada, cor amarela predominante nas flores e legumes inflados, contendo em média de 10 a 20 sementes de aspectos liso e coloração marrom. Os legumes/vagens quando próximo à deiscência, ao serem agitados emitem um som semelhante ao de um guizo de cobra cascavel. Desta característica deriva a denominação do gênero *Crotalaria*, que em latim significa chocalho, bem como os nomes populares guizo-de-cascavel, xique-xique e crotálaria (BARRETO et al., 2006; AREMU et al., 2012; SILVA-LÓPEZ; PACHECO, 2013; GARCIA; CIFUENTES SÁNCHEZ, 2011).



Figura 1. Foto das sementes de *Crotalaria retusa*. Legumes/Vagens apresentam coloração do marrom-escuro ao preto quando maduros com cerca de 3-4 cm de comprimento. As sementes são lisas e de coloração marrom medido cerca de 4,5 mm de comprimento. Foto: Autor.

2.3 FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO

Para garantir a homeostase e sobrevivência frente a agentes infecciosos, o organismo necessita eliminá-los, geralmente ocorrendo por uma resposta complexa que é a inflamação (KUMAR et al., 2013a).

A palavra inflamação deriva do latim *inflammare* (em chamas), creditado o uso do termo à Celsus no 1º século d.C. (SCOTT et al., 2004; LIBBY; 2007). Ele descreveu os quatro sinais cardinais da inflamação ou sinais clássicos: *rubor* (vermelhidão, hiperemia), *tumor* (inchaço ocasionado devido uma maior permeabilidade local da microvasculatura e extravasamento de proteínas para o espaço intersticial), *calor* (associado ao aumento do fluxo sanguíneo e atividade metabólica dos mediadores celulares da inflamação) e *dolor* (em parte devido as mudanças na perivasculatura e associado com as terminações nervosas). A *Functio laesa* (disfunção ou perda de função dos órgãos envolvidos) juntou-se como uma das cinco características da inflamação a partir dos escritos de Rudolf Virchow em 1850 (SCOTT et al., 2004; LIBBY, 2007; CIACCIA, 2011; LIAO et al., 2013).

A inflamação é uma resposta adaptativa iniciada por estímulos e condições nocivas exógenas/endógenas (ex.: trauma físico, infecção, exposição a corpos estranhos, calor, e lesão tecidual dentre outros) aos tecidos vivos (MEDZHITOV, 2008; PULLAMSETTI et al., 2011; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; AMDEKAR et al., 2012; ASHLEY et al., 2012; CHATTERJEE et al., 2012; OKIN; MEDZHITOV, 2012; BRITANNICA ACADEMIC, 2015).

Trata-se de um mecanismo de defesa desencadeado por uma complexa cascata de eventos celulares e bioquímicos coordenados, que tem por objetivo encontrar e eliminar ou isolar o agente causador da lesão, remover os componentes danificados, para que haja a restauração estrutural e funcional do tecido, mediada principalmente por macrófagos teciduais residentes e recrutados (NATAN, 2002; BARBOSA-FILHO et al., 2006; PIRES, 2007; MEDZHITOV, 2008; MULLER et al., 210; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; ASHLEY et al., 2012; SILVA et al., 2013b; BRITANNICA ACADEMIC, 2015).

O processo inflamatório é didaticamente dividido quanto a duração (aguda e crônica) e localização (local e sistêmica) (OKIN; MEDZHITOV, 2012). A fase aguda é caracterizada pelo início rápido, logo após o reconhecimento do estímulo nocivo e duração relativamente curta. Nessa fase ocorre rápido aumento da permeabilidade microvascular (vasodilatação), com imediata elevação do fluxo sanguíneo, dessa maneira, permitindo a migração seletiva de proteínas plasmáticas e de leucócitos, principalmente neutrófilos, seguido pela ativação das células residentes (mastócitos e macrófagos), com subsequente proliferação, dando início à produção de mediadores inflamatórios e desencadeamento dos quatro sinais cardinais da inflamação (LIBBY, 2007; PULLAMSETTI et al., 2011; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; ASHLEY et al., 2012; RODRIGUES, 2012; BRITANNICA ACADEMIC, 2015).

O sucesso da resposta inflamatória aguda resulta na eliminação do agente agressor, seguido pela resolução e reparo tecidual e retorno ao estado de homeostasia (BARTON, 2008; MEDZHITOV, 2008; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Por outro lado, quando os mecanismos endógenos anti-inflamatório falham em eliminar o processo infeccioso, ocorre o acúmulo de linfócitos e macrófagos, dano tecidual e perda de função, caracterizando dessa

forma, a inflamação do tipo crônica (PULLAMSETTI et al., 2011; RODRIGUES, 2012).

2.3.1 Alterações vasculares durante a inflamação

Quando ocorre dano tecidual, os capilares sanguíneos na área afetada sofrem vasoconstrição momentânea, logo em seguida, ocorre a vasodilatação local, facilitando que mediadores e células inflamatórias cheguem ao sítio acometido. A vasodilatação é mediada pela liberação de histamina, prostaglandinas e óxido nítrico culminando no aumento do fluxo sanguíneo na área afetada (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; PIORNEDO, 2010; BRITANNICA ACADEMIC, 2015). Este último evento é caracterizado pela elevação da permeabilidade da microvasculatura, ocasionada pela ruptura das junções das células endoteliais, facilitando assim, o efluxo de neutrófilos pela seletividade vascular e por fim, a formação do edema, com o intuito de amplificar a reação inflamatória e influenciando sua evolução (Figura 2) (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; MEDZHITOV, 2008; COUTINHO et al., 2009; SPRAGUE; KHALIL, 2009; PULLAMSETTI et al., 2011; KELLEY et al., 2014; BRITANNICA ACADEMIC, 2015). As reações vasculares durante o processo infeccioso são cruciais para a cessação do estímulo nocivo e recuperação tecidual do local acometido (RODRIGUES, 2012).

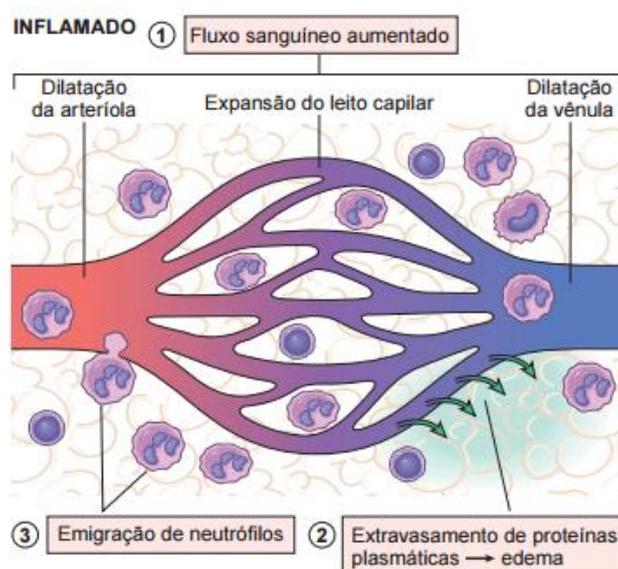


Figura 2. Alterações celulares e vasculares da inflamação aguda. Fonte: Kumar et al., 2013a, p, 31.

Com o extravasamento de fluído e de outras substâncias (água e proteína) dos vasos sanguíneos, o fluxo sanguíneo torna-se mais lento, devido ao aumento da pressão hidrostática capilar, favorecendo a concentração de eritrócitos na microsvaculatura e elevação da viscosidade sanguínea. Ao mesmo tempo, a perda de proteínas plasmática para o interstício, diminui a pressão oncótica intravascular, permitindo assim, a migração dos leucócitos circulantes do lúmen do vaso para o interstício: rolamento ao longo da superfície endotelial, adesão firme e transmigração (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; ALLER et al., 2007).

2.3.2 Células envolvidas na resposta inflamatória

Os eventos celulares são mediados por células comumente presentes nos tecidos, como macrófagos e mastócitos residentes e células endoteliais, fornecendo uma rápida resposta ao estímulo nocivo ou por aquelas (plaquetas e leucócitos) que através da circulação transmigraram para o sítio inflamatório (NATHAN, 2002; PIRES, 2007; COUTNHO et al., 2009).

Na fase inicial da inflamação, os mastócitos são as primeiras células envolvidas, logo em seguida, macrófagos e células dendríticas, juntos reconhecem e liberam citocinas e mediadores inflamatórios pré-formados (histamina, prostaglandinas e leucotrienos), dando início aos eventos inflamatórios (vasodilatação, formação do edema e migração leucocitária). Esses mediadores inflamatórios facilitam a migração dos leucócitos até o processo infeccioso (NATHAN, 2002; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; MEDZHITOV, 2008).

A infiltração leucocitária até o sítio inflamatório é um evento necessário para neutralização e remoção do agente nocivo (bactérias, fungos, infecção viral, invasão parasítica e resposta alérgica), ocorrendo em múltiplas etapas, ditadas por uma ativação sequencial de proteínas adesivas (selectinas e integrinas), de seus ligantes expressos tanto nos leucócitos quanto nas células do endotélio e coordenada por vários mediadores que estimulam a quimiotaxia das células brancas como também de células fagocíticas (WAGNER; ROTH 2000; PIRES, 2007; MASKREY et al., 2011).

A captura e rolamento dos neutrófilos circulantes do lúmen vascular ao endotélio é mediada por selectinas (E, P e L) e lectinas endógenas. Sua ativação é modulada por uma interleucina (IL-8) e a adesão ocorre por meio da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e ligação das β_2 integrinas aos neutrófilos (LEY, 2002; PIRES, 2007). Essa seletividade impede que os eritrócitos passem do meio intra para o meio extravascular (MEDZHITOV, 2008; COUTINHO et al., 2009; RODRIGUES, 2012; BRITANNICA ACADEMIC, 2015).

A cascata de adesão leucocitária compreende elementos de 1) marginação dos leucócitos circulantes do lúmen vascular do centro do fluxo sanguíneo para a periferia do vaso; 2) captura mediada por proteínas adesivas e integrinas (glicoproteína transmembrana da matriz extracelular); 3) rolamento ao longo das paredes do vaso; 4) adesão por intermédio de moléculas de adesão de ICAM-1 e imunoglobulinas; 5) transmigração (diapedese) pelo achatamento dos leucócitos; e 6) migração até o local acometido devido à estímulos quimiotáticos (Figura 3) (WAGNER; ROTH 2000; LEY, 2002; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; YONEKAWA; HARLAN, 2005; PIRES, 2007; KUMAR et al., 2013a).

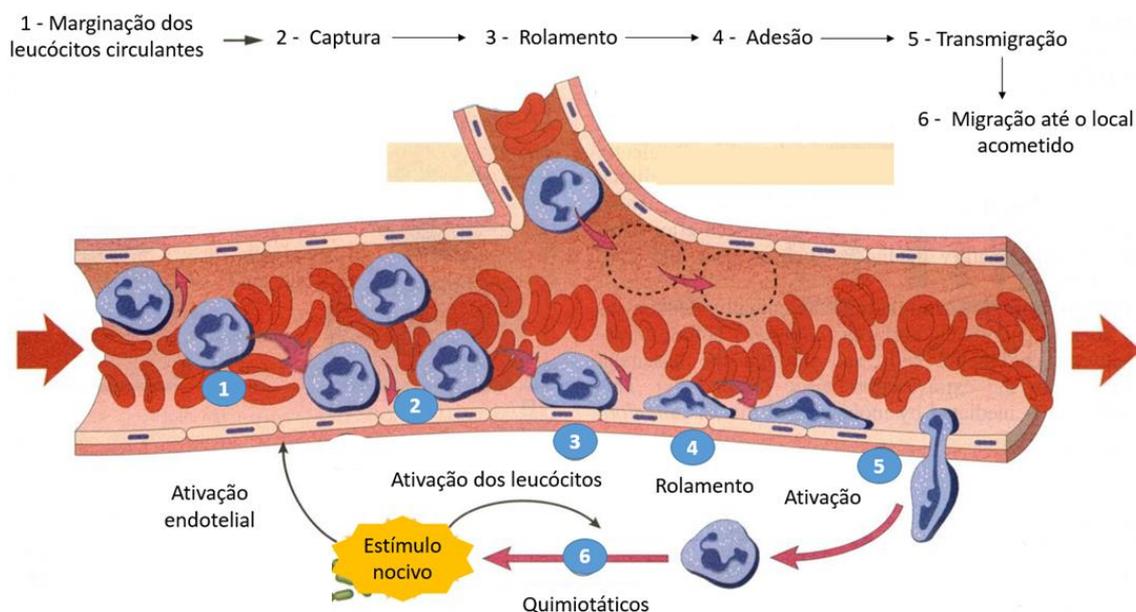


Figura 3. Migração leucocitária ao sítio inflamado. Adaptada. Fonte: http://cai.md.chula.ac.th/chulapatho/chulapatho/lecturenote/inflammation/New%20Slides%20for%20Molecular%20inflammation/Molecular%20inflammation/Inflammation_pic04.html

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico e estão entre as primeiras células que chegam ao sítio inflamado (perdendo apenas para as células dendríticas), seguido pelo influxo tardio de monócitos (BARTON, 2008; CRUVINEL et al., 2010). Tornam-se ativos com o contato direto com o agente nocivo ou através da ação do Fator de Necrose Tumoral (TNF), leucotrienos e citocinas secretadas pelos próprios macrófagos e mastócitos (células residentes) e por outros neutrófilos (NATHAN, 2002; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; MEDZHITOV, 2008). Os leucócitos no local da inflamação podem iniciar e manter o dano tecidual pela liberação do conteúdo de seus grânulos e de diversos mediadores inflamatórios (YONEKAWA; HARLAN, 2005).

Os neutrófilos ativos removem os tecidos lesados e os agentes nocivos por meio da fagocitose. Essa ação ocorre pela liberação do conteúdo de seus grânulos, e pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), peptídeos catiônicos, eicosanoides e proteases (elastase, catepsina G, proteinase 3, dentre outros) (EMING et al., 2007; BARTON, 2008). Esses efetores da inflamação não fazem discriminação entre os agentes nocivos e componentes teciduais e, conseqüentemente, acabam por causar dano tecidual (NATHAN, 2002). Macrófagos e monócitos também são capazes de engolfar o agente nocivo e debris celulares (CRUVINEL et al., 2010; SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

2.3.3 Mediadores inflamatórios

Os mediadores solúveis são os responsáveis pela coordenação da resposta inflamatória através de uma complexa rede regulatória, causando alterações vasculares e celulares. Para uma melhor compreensão desta rede é necessário diferenciar entre indutores (exógenos e endógenos) e mediadores inflamatórios (MEDZHITOV, 2008; KUMAR et al., 2013a)

Os indutores sinalizam o início da resposta inflamatória, ativando os sensores especializados e por fim, promovem a produção de um conjunto de mediadores de origem plasmática e celular. Os mediadores são os efetores da inflamação, alterando o estado funcional dos tecidos e dos órgãos acometidos (MEDZHITOV, 2008; CRUVINEL et al., 2010).

Diante do contexto, a resposta inflamatória se inicia a partir do reconhecimento do agente indutor, seja pela exposição das células ao estímulo nocivo e/ou lesão tecidual com subsequente liberação de mediadores solúveis advindos do tecido, das células residentes do sítio inflamatório ou derivados a partir de precursores inativos da circulação (COUTNHO et al., 2009; SOUTO et al., 2011; KUMAR et al., 2013a).

Esses mediadores promovem mudanças nas células endoteliais do vaso acometido (vasodilatação), modulam os eventos inflamatórios (elevação da permeabilidade) e as células envolvidas (migração leucocitária) (RODRIGUES, 2012; BARTON, 2008). Os mediadores são classificados em aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (MEDZHITOV, 2008; CRUVINEL et al., 2010).

Aminas vasoativas (histamina e serotonina) são mediadores pré-formados e estocados nos grânulos dos mastócitos, basófilos e plaquetas degranuladas (MEDZHITOV, 2008; KUMAR et al., 2013a). Durante a reação inflamatória aguda estão entre os primeiros a serem liberados e envolvidos na vasoconstricção inicial, e coletivamente com outros mediadores (citocinas, prostaglandinas e leucotrienos), causam o aumento da vasodilatação e permeabilidade no local inflamado (VAN AMERSFOORT et al., 2003; ALLER et al., 2007; BARTON, 2008; MEDZHITOV, 2008; KUMAR et al., 2013a).

A substância P e precursores proteolíticos (cininas, fibrinopeptídeo A e B e produtos da degradação de fibrina) são responsáveis pela estocagem e geração de peptídeos vasoativos respectivamente. A bradicinina gerada a partir da ação proteolítica sobre cininogênios aumenta a vasodilatação e permeabilidade, além de ser um potente pro-algésico, tendo seu efeito potencializado com ação das prostaglandinas (MEDZHITOV, 2008; CRUVINEL et al., 2010; PIORNEDO; 2010 RODRIGUES, 2012).

Os fragmentos do complemento C3a, C4a e C5a são produzidos por várias vias de ativação do sistema complemento, alteram a permeabilidade vascular através da ativação de mastócitos e neutrófilos. O C5a atua como quimiotático para neutrófilos contribuindo significativamente para o

desenvolvimento da resposta inflamatória (MEDZHITOV, 2008; CRUVINEL et al., 2010).

A fosfatidilcolina dá origem aos mediadores lipídicos eicosanoides e fator de ativação plaquetária (PAF). O ácido lisofosfatídico e o ácido araquidônico são formados a partir da ativação da fosfolipase A₂, este último é metabolizado por eicosanoides ou pelas cicloxigenases (COX1 e 2), dando origem a prostaglandinas e tromboxanos ou lipoxigenases (FALCÃO et al., 2005; MEDZHITOV, 2008). A prostaglandina (PGE₂) e prostaciclina (PGI₂), por sua vez, estimulam a produção de uma grande quantidade de mediadores pró-inflamatório, causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, dessa maneira, contribuem para formação do edema e transmigração de neutrófilos e monócitos (MEDZHITOV, 2008; MUELLER et al., 2010; RODRIGUES, 2012).

As citocinas inflamatórias incluem fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-12 e IL-18 (MATOS, 2008; MEDZHITOV, 2008; MUELLER et al., 2010; SOUTO et al., 2011). Elas são produzidas por muitos tipos celulares, como linfócitos, macrófagos e mastócitos, esses dois últimos os produtores mais importantes (MATOS, 2008; MEDZHITOV, 2008; CRUVINEL et al., 2010). As citocinas inflamatórias exercem efeito autócrino, parácrino e endócrino (PIORNEDO, 2010), atuando na resposta inflamatória na ativação e indução das células do endotélio e leucócitos em resposta ao processo inflamatório (MATOS, 2008; MEDZHITOV, 2008; MUELLER et al., 2010; SOUTO et al., 2011). As citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10, IL-13, IFN- α e fator transformante de crescimento antagonizam os efeitos das citocinas inflamatórias (MUELLER et al., 2010).

As quimiocinas fazem parte de um grupo de citocinas quimiotáticas, responsáveis por “sinalizar” o local inflamado aos leucócitos e controlar o seu extravasamento. Elas podem ser de dois tipos, constitutivas ou induzidas. No primeiro caso, trata-se daquelas produzidas pelos tecidos lesados. Já as induzidas ou inflamatórias são produzidas por várias células em resposta aos indutores da inflamação (MEDZHITOV, 2008; CRUVINEL et al., 2010).

As enzimas proteolíticas (elastase, catepsinas e metaloproteinases da matriz) agem degradando a matriz extracelular e as proteínas da membrana

basal, facilitando a transmigração leucocitária (MEDZHITOV, 2008; KELLEY et al., 2014) e por fim, as lipoxinas, atuam inibindo o recrutamento de neutrófilos e promove dos monócitos, ao qual estes acabam por remover células mortas e iniciam a resolução e reparo tecidual dando fim ao processo inflamatório (MEDZHITOV, 2008).

Diante do exposto, os processos envolvidos na inflamação são: mudanças nas ações das células endoteliais, ação de mediadores inflamatórios, aumento do fluxo sanguíneo, da vasodilatação e da permeabilidade vascular, migração leucocitária, fagocitose e restauração da homeostase tecidual (FALCÃO et al., 2005; MEDZHITOV, 2008).

2.4 FISIOPATOLOGIA DA DOR

A dor refere-se a uma sensação desagradável, um processo fisiológico e essencial, um sinal de advertência ao estimular respostas comportamentais, psicológica, autonômica e motora, com o intuito de proteção contra o atual dano ou futuros, fundamental para a sobrevivência (PATEL, 2010; SILVA; RIBEIRO-FILHO, 2011; CAMPOS, 2013).

Trata-se de umas das características dos sinais cardinais da inflamação, no entanto, se faz necessário o entendimento entre dor nociceptiva (fisiológica) e dor patológica (clínica). No primeiro caso, refere-se a dor temporária, típico de dor aguda, necessitando de um estímulo de intensidade elevada para sua deflagração (KIDD; URBAN, 2001; KLAUMANN, et al., 2008; COUTINHO, 2009; PATEL, 2010). Já a dor patológica é comumente contínua, com constante estimulação dos nociceptores (ação da PGE₂ sob os neurônios sensoriais periféricos), na maioria das vezes, associada com a inflamação (KIDD; URBAN, 2001; COUTINHO, 2009; PATEL, 2010; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

O termo nocicepção é proveniente do latim *nocere*, (prejudicar). Trata-se do processo sensorial que é iniciado, ou seja, da detecção do estímulo nocivo e sua subsequente transmissão codificada ao cérebro por meio do sistema nociceptivo (KIDD; URBAN, 2001; PATEL, 2010; SILVA et al., 2013b). Por outro lado, dor refere-se a percepção de um sentimento ou sensação que surge em resposta à tal atividade, chamada de dor, descrita variavelmente como irritante, dolorido, pungente, doendo, latejante ou insuportável (KIDD; URBAN, 2001;

PATEL, 2010). Animais não possuem a capacidade de expressar de forma verbal as características subjetivas da dor, desde modo, neles avalia-se a nocicepção (SILVA et al., 2013b).

A dor pode ser classificada quanto à duração do estímulo, tipo de lesão e os mediadores envolvidos (SILVA et al., 2013b). A dor aguda trata-se de uma dor de início repentino e duração provavelmente limitada (READY; EDWARDS, 1992). Por outro lado, a dor crônica caracteriza-se pela duração prolongada além da resposta de cura ou progresso, mesmo sem lesão tecidual aparente (McCURDY; SCULLY, 2005; KLAUMANN, et al., 2008). Quanto ao tipo de lesão e mediadores envolvidos, ela pode ser; inflamatória (lesão tecidual); neuropática (disfunção de um nervo); psicogênica (fatores psicológicos) e nociceptiva (estimulação excessiva dos nociceptores) (MILLAN, 2002; CORDEIRO, 2013).

As diferentes modalidades de estímulos (mecânico, térmico e químico) a partir da periferia, geram potenciais de ação que são reconhecidos (transdução) pelos neurônios aferentes de primeira ordem (condução), onde localiza-se os nociceptores periféricos, passam pelo corno dorsal da medula espinhal (transmissão) transmitindo a informação aos neurônios secundários e são decodificados no sistema nervoso central (SNC), ocorrendo então a percepção dolorosa (KIDD; URBAN, 2001; PIRES, 2007; MARCHAND, 2008; CORDEIRO, 2013). Esses neurônios são constituídos por dois tipos de fibras: fibras aferentes do tipo A e C, não mielinizadas e pouco mielinizadas respectivamente (MEOTTI, 2006; BASBAUM, 2009; SILVA, et al., 2013b). Essas fibras enviam os sinais para o corno posterior da medula com subsequente geração de dor (CORDEIRO, 2013).

As fibras do tipo C propagam o estímulo nervoso mais lentamente, ao contrário das fibras do tipo A. Esta última pode ser dividida em nociceptores A δ do tipo I e II, diferindo quanto a responsividade ao calor intenso, estimuladas na faixa de 53°C e por volta dos 43°C respectivamente (MEOTTI, 2006; BASBAUM, 2009; SILVA et al., 2013b). Os estímulos térmicos, mecânicos e químicos sensibilizam as fibras do tipo C (polimodais). Já as fibras do tipo A δ respondem aos estímulos mecânicos e mecanotérmicos (PATEL, 2010).

Durante a lesão celular, ocorre a ativação dos nociceptores periféricos modulada pela liberação de mediadores (produzidos ou secretados) agindo

sobre as terminações nervosas. Estes mediadores (serotonina, bradicinina, histamina, prostaglandinas, leucotrienos e substância P) exercem influência na intensidade das sensações dolorosas, seja pela ativação direta das terminações nervosas ou pela potencialização da sensibilidade a qualquer estímulo (DRAY, 1995; CARVALHO, 2008; PATEL, 2010).

Diante do exposto, plantas e seus constituintes apresentam potencial terapêutico cientificamente comprovado e tantas outras ainda em fase experimental, como por exemplo, a *Crotalaria retusa*. No presente estudo, frações proteicas obtidas a partir de sementes de *C. retusa* serão avaliadas quanto ao seu potencial anti-inflamatório e antinociceptivo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar e avaliar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo de proteínas isoladas a partir de sementes de *Crotalaria retusa* utilizando modelos experimentais em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter frações proteicas presente na farinha das sementes de *C. retusa*;
- Caracterizar o perfil proteico através de eletroforese unidimensional;
- Detectar a presença de atividade lectínica em cada fração proteica através do ensaio de atividade hemaglutinante frente a eritrócitos humanos;
- Avançar na purificação de lectinas através de cromatografia de afinidade utilizando coluna de guar gum
- Investigar a capacidade das proteínas de *C. retusa* em inibir o efeito edematogênico provocado por carragenina e dextrana em camundongos;
- Avaliar por meio dos modelos de edema de pata e peritonite induzida por carragenina se a resposta anti-inflamatória das frações proteicas de *C. retusa* envolve vias de inibição de migração celular;
- Avaliar a atividade antinociceptiva por meio de modelos experimentais de estímulos químicos (contorções abdominais induzido ácido acético e o tempo de lambida da pata induzida por formalina)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DROGAS E REAGENTES

Para a realização dos experimentos foram utilizados os seguintes reagentes: λ -carragenina, dextran, ácido acético, formaldeído pertencentes a *Sigma Chemical (Saint Louis, MO, EUA)*. A morfina foi comprada da empresa Merck, São Paulo, Brasil.

4.2 COLETA E FRACIONAMENTO DA FARINHA DE SEMENTES DE *Crotalaria retusa*

Vagens de *Crotalaria retusa* (Fabaceae) foram coletadas no Município de Parnaíba, Estado do Piauí, Brasil (02°54'17"S 41°46'36"O) em áreas descampadas da cidade. No laboratório as sementes foram lavadas em água corrente com o intuito de retirar resíduos e subsequente separação das mesmas.

A etapa seguinte foi a pesagem e trituração para formação de uma farinha de fina granulação. Esse material foi utilizado para o fracionamento e obtenção das frações proteicas de acordo com o grau de solubilidade segundo o método de Osborne.

Inicialmente, cinco gramas da farinha foram adicionados a 50 mL de NaCl 0,5 M (proporção de 1:10) em agitação constante durante 4 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, centrifugadas a 28.714 g por 20 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi submetido a diálise contra água destilada com trocas a cada 6 horas totalizando um total de 72 horas. Ao término deste período, houve uma nova centrifugação nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante resultante compõe a fração albumina (Alb) e o precipitado a fração globulina (Glb). As frações foram liofilizadas e utilizadas em todas as análises experimentais.

4.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

4.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese seguiu a metodologia descrita por Laemmli (1970) com algumas modificações. Neste experimento, o material liofilizado foi analisado quanto ao perfil proteico das frações obtidas. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris-HCl 65 mM, pH 6,8), contendo 10% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e glicerol 10%. Após as corridas, o gel de poliacrilamida 12,5% foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-350 por 2 horas. Em seguida o gel foi descorado com uma solução de ácido acético: metanol: água destilada (1:3:6, v:v:v). Ao término deste processo, as proteínas foram visualizadas como bandas azuis no gel transparente.

4.3.2 Cromatografia de afinidade em coluna de guar gum

A purificação das frações Alb e Glb e isolamento de lectina ocorreu utilizando cromatografia por afinidade em coluna de guar gum. Foi pesado 10 mg das frações Alb e Glb e diluídas separadamente em 3 mL de água destilada. Posteriormente foram centrifugadas por 5 minutos à 2.202 g. Para a adsorção da amostra, em momentos diferentes, o sobrenadante de cada fração foi aplicado à coluna de guar gum previamente equilibrada. Após a aplicação total do sobrenadante à coluna, a amostra foi deixada em contato com a fase estacionária repousando por 15 minutos. A eluição do pico não retido (pI), foi realizada com a aplicação de uma solução de NaCl 150 mM, coletando 15 tubos com volume aproximado de 2 mL. A eluição do pico retido (pII) ocorreu com a aplicação de uma solução de 100 mM de HCl, coletando 15 tubos com volume aproximado de 2 mL.

A análise da absorbância de pI e pII foi realizada no comprimento de 280 nm em espectrofotômetro. Posteriormente o material foi parcialmente liofilizado e congelado.

4.3.3 Determinação da presença de lectinas através de ensaio de atividade hemaglutinante

Foram coletadas amostras de sangue humano (A, B, AB e O). Esta correu de maneira asséptica em tubos de coleta a vácuo contendo heparina. Os eritrócitos foram lavados quatro vezes com solução salina de NaCl a 0,15 M, e subsequente centrifugação a $1.000 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o precipitado (polpa de hemácias) utilizado para preparar a solução de hemácias a 2% (v/v).

Placas de microtitulação de 96 poços contendo 12 fileiras com 8 poços cada foram utilizadas para a determinação da atividade hemaglutinante das frações proteicas obtidas (Alb e Glb), ocorrendo adição de 100 μ L nas primeiras fileiras e 100 μ L de NaCl 0,15M nas demais.

O ensaio de atividade hemaglutinante foi realizado através de diluições seriadas em duplicada de 100 μ L das amostras (Alb e Glb). Ao fim dessa etapa, foi adicionado 100 μ L da solução de eritrócitos padronizada a 2,0% (v/v) às diluições. Por um período mínimo de 2 horas as placas foram mantidas em temperatura ambiente para análise macroscópica da aglutinação, com posterior comparação com os respectivos controles negativos (sem material proteico, somente contendo a suspensão de eritrócitos). A atividade hemaglutinante foi expressa como a concentração mínima de proteína (UA/ μ g) ainda capaz de causar hemaglutinação.

A concentração relativa de proteínas das frações Alb e Glb foi estimada pelo método de Bradford (1975).

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Nos ensaios biológicos foi testado o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo das frações proteicas de sementes de *Crotalaria retusa* em camundongos. Os experimentos foram realizados com a utilização de camundongos Swiss fêmeas (*Mus musculus*) pesando entre 25 – 28g (n = 6), fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas em ambiente com fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 25°C e com água e ração comercial *ad libitum*. Os experimentos

seguiram as diretrizes e aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI (CEEA-UFPI, Protocolo N.º 035/15, Anexo I). Para a realização dos experimentos as amostras foram solubilizadas em solução salina estéril (NaCl 0,9%).

4.4.1 Edema de pata induzido por carragenina

O modelo edema de pata induzido por carragenina foi desenvolvido conforme descrito por Winter, Risley e Nus (1962). De início o experimento foi conduzido com a utilização de diferentes doses (5, 10 e 20mg/kg) das frações proteicas (Alb e Glb) com o intuito de definir a melhor dose. As doses foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) nos animais. Transcorridos 30 minutos foi administrada carragenina (500µg por pata/50µL), injetada em 0,1 mL de salina estéril por meio de injeção subplantar (i.s) na pata traseira direita dos camundongos. O volume das patas foi mensurado através de um pletismômetro (Ugo-Basile 7140) imediatamente após a injeção (volume basal) e nos intervalos de 1, 2, 3 e 4 horas após a carragenina. O controle negativo recebeu salina estéril (NaCl 0,9%) no peritônio e na pata. Indometacina (Indo 10mg/kg; i.p.) foi utilizada como droga padrão para inibição do edema de pata induzido por carragenina.

4.4.2 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A migração neutrofílica na pata dos animais ocasionada pela inflamação induzida por carragenina foi indiretamente avaliada por meio do ensaio de dosagem de mieloperoxidase (MPO). Para isto, após 4 horas de avaliação do edema induzido por carragenina, os camundongos foram eutanasiados e imediatamente foi realizado a remoção do tecido inflamado da pata traseira direita. Foram fragmentados os tecidos por meio de maceração em 1 mL de tampão fosfato de potássio com 0,5% de hexadecil-trimetil-amônio brometo, na proporção de 1 mL de tampão para 50mg de tecido. O homogeneizado foi centrifugado a 40.000 x g durante 20 minutos a 4°C. Ao término desse processo, foi feita a pipetagem do material em duplicata, 10 µL do sobrenadante e 200 µL de uma solução de o-dianisidina (5mg/3mL tampão fosfato) contendo 15 µL de

H₂O₂ 1%, nos poços de uma placa de ELISA. Foi avaliada a mudança na absorbância, a 450nm, entre os tempos 0 e 1 minuto e os resultados foram expressos como Unidades de MPO/mg de tecido (BRADLEY et al., 1982).

4.4.3 Edema de pata induzido por dextrana

Os animais foram tratados com as frações Alb e Glb (20mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). Transcorrido uma hora, foi administrado dextrana (500µg por pata/50µL) através de i.s. na pata traseira direita dos animais. O grupo controle negativo recebeu apenas solução salina na cavidade peritoneal e na pata. O volume das patas foi mensurado através de um pletismômetro (Ugo-Basile 7140) imediatamente após a injeção (volume basal) e nos intervalos de 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas após a aplicação de dextrana.

4.4.4 Peritonite induzida por carragenina

O modelo de peritonite foi conduzido para avaliar a potencial das frações albuminas ou globulinas em reduzir a migração celular ocasionada pela inflamação induzida por carragenina. Os animais foram tratados com as frações na dose de 20mg/kg por via intraperitoneal. Decorrido 1 h foi administrado 250 µL de carragenina (500µg/kg) na cavidade abdominal dos animais. Ao final de 4 horas os animais foram eutanasiados para a obtenção do lavado peritoneal. Foi realizada a lavagem da cavidade peritoneal com 1,5 mL de PBS e o exsudado transferido para um tubo de ensaio devidamente identificado para cada animal. A partir destas amostras foram realizadas contagem total e diferencial dos leucócitos de acordo com a metodologia descrita por Souza e Ferreira (1985).

Para a contagem total de células, 20 µL do exsudado foram diluídos em 380 µL de solução de Turk. Desta solução, foram transferidos de 15 a 20 µL para uma câmara de Neubauer e analisado ao microscópio óptico. Na contagem diferencial, 20 µL do exsudado foram colocados em uma lâmina de vidro e centrifugados por 10 minutos a 2.000 x g. Em seguida foi realizada a coloração dos esfregaços com hematoxilina-eosina (HE), com subsequente visualização no microscópio óptico e contabilização da quantidade de neutrófilos.

Indometacina (Indo: 10mg/kg; i.p.) foi utilizada como droga padrão para inibição da migração leucocitária para cavidade peritoneal dos animais.

4.4.5 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético foi conduzido de acordo com o método descrito por COLLIER et al., (1968). Os animais foram tratados com as frações Alb e Glb (20mg/kg, i.p.) 1 h antes da indução ou morfina (5mg/kg, subcutânea, droga analgésica padrão) 30 minutos antes. No peritônio foi administrado uma solução de ácido acético 0,6% (10mL/kg de peso corporal). Após 10 minutos do estímulo algico, foi observado e quantificado o número de contorções abdominais dos animais durante um período de 20 minutos. Os animais controle receberam apenas o ácido acético no peritônio.

4.4.6 Teste da formalina

O modelo de labedura de pata induzida por formalina foi reproduzido segundo o método descrito por Sufka et al., (1998) com modificações. Inicialmente os camundongos foram tratados com as frações Alb e Glb (20mg/kg, i.p.) ou com morfina (5mg/kg, s.c.), 1 h ou 30 minutos, respectivamente, antes do estímulo algico. Formalina foi administrada (2,5%, 20 µL por pata) na região plantar da pata traseira direita dos animais e imediatamente quantificado o tempo (em segundos), em que o animal permaneceu lambendo a pata que recebeu o agente. A análise foi realizada durante os primeiros 5 minutos (1ª fase, neurogênica) e de 20 a 25 minutos (2ª fase, inflamatória) após indução. Os grupos controles receberam apenas formalina (positivo) e salina (negativo) na pata.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Os resultados obtidos apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Os dados dos modelos edema de pata, dosagem de mieloperoxidase e antinociceptivo das frações proteicas das sementes da *C.*

refusa, foram comparados pela análise de variância (ANOVA) com subsequente teste de Newman–Keuls. A diferença estatística foi considerada significativa quando p valor for $< 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análise do perfil proteico das frações Alb e Glb por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Foi realizada eletroforese SDS-PAGE com o intuito de visualização do perfil das frações proteicas Alb e Glb de sementes de *C. retusa* (Figura 4). A análise do perfil eletroforético das frações revelaram a presença de pelo menos quatro bandas com massa molecular variando aproximadamente entre 21,1 a 64,0 Kda.

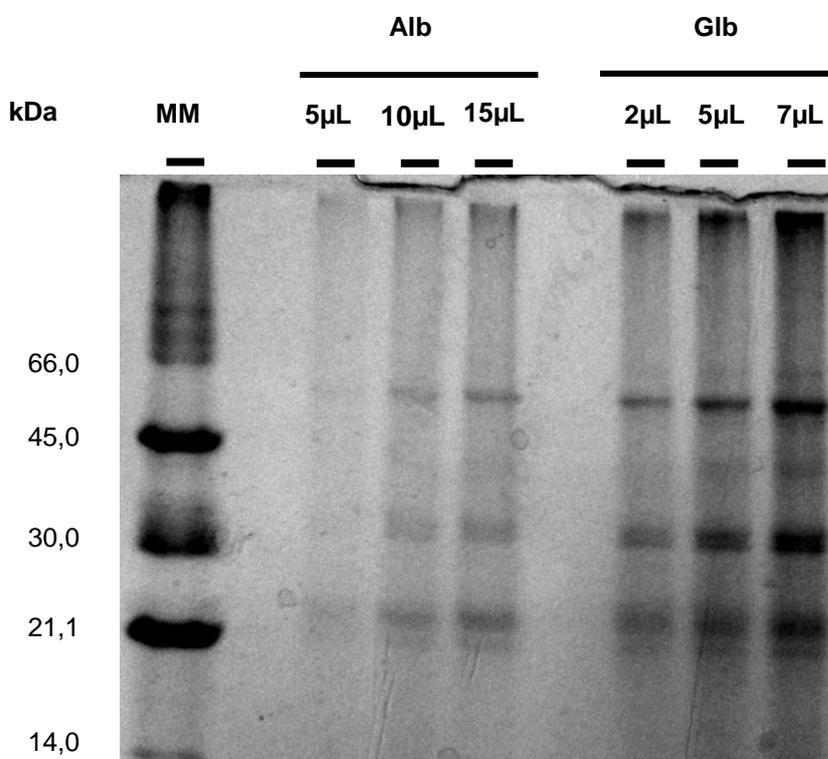


Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) das frações proteicas albumina e globulina de sementes de *C. retusa*. As frações foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625M (pH 6,8) contendo 2% de SDS e aplicadas nos poços do gel. O gel foi corado com uma solução de azul brilhante de Coomassie R-350 0,1%. Marcadores de massa molecular (**MM**): albumina (66,0kDa); ovalbumina (45,0kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lactalbumina (14,4 kDa).

5.2 Potencial anti-inflamatório

5.2.1 Edema de Pata induzido por carragenina

A atividade anti-inflamatória das frações de *C. retusa* foi inicialmente testada através dos modelos de edema de pata induzido por carragenina. Os

dados obtidos encontram-se sumarizados na Tabela 2. A injeção subplantar de carragenina provocou a formação de edema significativa 1 h após a sua administração, com elevação gradativa, mantida até a 4ª h estudada, alcançando a resposta máxima na formação do edema na 3ª h. Como esperado, o pré-tratamento dos animais com indometacina inibiu o edema induzido por carragenina de modo significativo ao longo de todo período experimental avaliado.

O efeito anti-inflamatório de todas as doses (5, 10 e 20mg/kg) das frações proteicas Alb e Glb foi observado a partir da 2ª hora em relação ao controle, contudo sem significância entre elas. O maior percentual de inibição do edema ocorreu na 3ª (Glb 20mg/kg) e 4ª h (Alb 20mg/kg) estudada (Tabela 2).

Tabela 2. A atividade anti-inflamatória de frações proteicas de sementes de *Crotalaria retusa* em edema de pata induzido por carragenina.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Edema de pata em mL (inibição em %)			
		1 h	2 h	3 h	4 h
Salina	-	0,016±0,004	0,012±0,004	0,016±0,002	0,010±0,005
Animais tratados com carragenina (500µg/pata)					
Controle (Cg)	-	0,055±0,0085#	0,080±0,006#	0,088±0,006#	0,082±0,008#
Indo	10	0,026 ± 0,002* (52,7%)	0,020 ± 0,005* (75,0%)	0,008 ± 0,003* (90,9%)	0,015 ± 0,003* (81,7%)
Albumina	5	0,036±0,004 (34,5)	0,046±0,000* (42,5)	0,050±0,013* (43,4)	0,032±0,009* (56,4)
	10	0,038±0,009 (30,9)	0,050±0,009* (37,5)	0,042±0,004* (52,5)	0,034±0,005* (53,6)
	20	0,036±0,005 (34,5)	0,044±0,009* (45,0)	0,028±0,004* (68,3)	0,014±0,007* (80,9)
Globulina	5	0,034±0,004 (38,2)	0,046±0,007* (42,5)	0,030±0,005* (66,0)	0,048±0,011* (34,5)
	10	0,034±0,011 (38,2)	0,048±0,008* (40,0)	0,034±0,008* (61,5)	0,048±0,013* (34,5)
	20	0,036±0,008 (34,5)	0,032±0,006* (60,0)	0,030±0,004* (66,0)	0,040±0,008* (45,5)

Os valores são dados como ± erro padrão da média (n=5). # e * indica diferença estatística em relação ao grupo salina (sal) e tratamento com carragenina (Cg), respectivamente. (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls).

Diante dos dados obtidos, a dose de 20mg/kg de ambas as frações, foi escolhida para análises posteriores, pois conferiu a melhor resposta inibitória contra a formação do edema de pata induzido por carragenina.

5.2.2 Determinação da atividade mieloperoxidase (MPO)

A capacidade das frações Alb e Glb de inibir a migração neutrofílica induzida pela administração de carragenina foi avaliada através da quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO), a partir de amostra de pata dos animais utilizados no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Nos animais que receberam carragenina (500 μ g/pata) na pata traseira direita foi observada uma elevação significativa da quantidade da atividade de MPO (270,9 \pm 44,94 UMPO/mg de tecido) em comparação ao grupo salina (149,9 \pm 24,81 UMPO/mg de tecido). Este aumento foi inibido naqueles animais pré-tratados com as frações Alb (131.3 \pm 19.67 UMPO/mg de tecido) e Glb (54.40 \pm 13.68 UMPO/mg de tecido) em 51,54% e 100,79% respectivamente. A indometacina foi utilizada como controle positivo de inibição da atividade da enzima MPO (Figura 5).

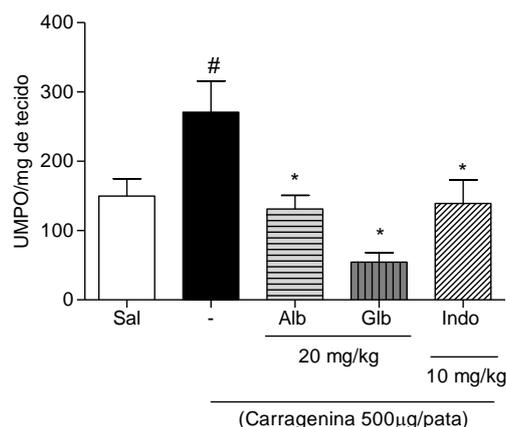


Figura 5. O efeito inibitório dos tratamentos com Alb e Glb (20mg/kg; i.p.) na atividade de mieloperoxidase em edema de pata induzido por carragenina. Os valores foram dados como a média \pm E.P.M. (n=5). # e * indica diferença estatística em relação ao grupo salina (sal) e tratamento com carragenina (Cg), respectivamente. (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls)

5.2.3 Edema de pata induzido por dextrana

Em seguida, as frações proteicas foram avaliadas quanto a capacidade de inibir o edema induzido por dextrana. A administração de dextrana provocou um edema significativo, com pico máximo nos primeiros 30 minutos (0.0220 \pm 0.008641 mL), em comparação ao grupo salina (0.01083 \pm 0.002847 mL), com gradual redução do volume da pata dos animais ao longo do curso temporal. O

pré-tratamento dos animais com Alb e Glb (20m/kg) não foram capazes de promover inibição significativa deste edema (Figura 6).

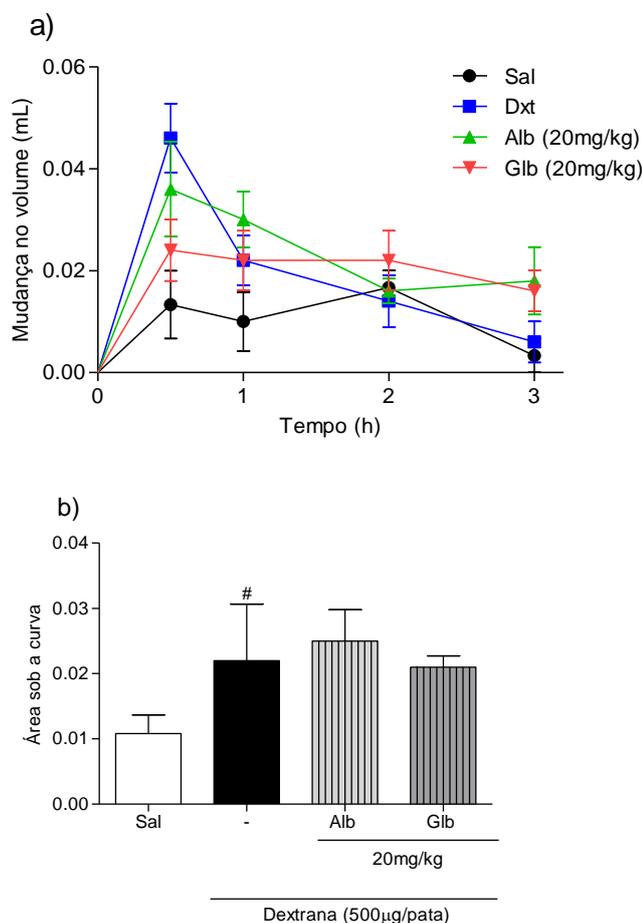


Figura 6. Efeito anti-inflamatório das frações de Alb e Glb de sementes de *Crotalaria retusa* em edema de pata induzido por dextrana. Os animais foram pré-tratados com doses de 20 mg/kg; i.p. uma hora antes do estímulo anti-inflamatório. **(a)** Os resultados representam a variação do volume do edema da pata durante o curso temporal do ensaio, onde cada ponto representa média \pm E.P.M. (n=5). **(b)** Valores da área sob a curva da formação do edema. # indica diferença estatística ($p < 0,05$) comparada ao grupo salina (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls).

5.2.4 Peritonite induzida por carragenina

O modelo de peritonite induzida por carragenina, foi outro ensaio utilizado para avaliação da atividade anti-inflamatória das frações proteicas, por meio da resposta de inibição da migração leucocitária ao local inflamado. A administração de carragenina por i.p. elevou de forma significativa tanto o número total de leucócitos, como o de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais em comparação ao grupo salina (Figura 7). As frações Alb e Glb (20mg/kg) inibiram significativamente as contagens de leucócitos totais em

59,82% e 62,65% e de neutrófilos em 72,19% e 97,90% respectivamente. Como esperado, a indometacina (10mg/kg) inibiu da migração celular ao foco inflamatório.

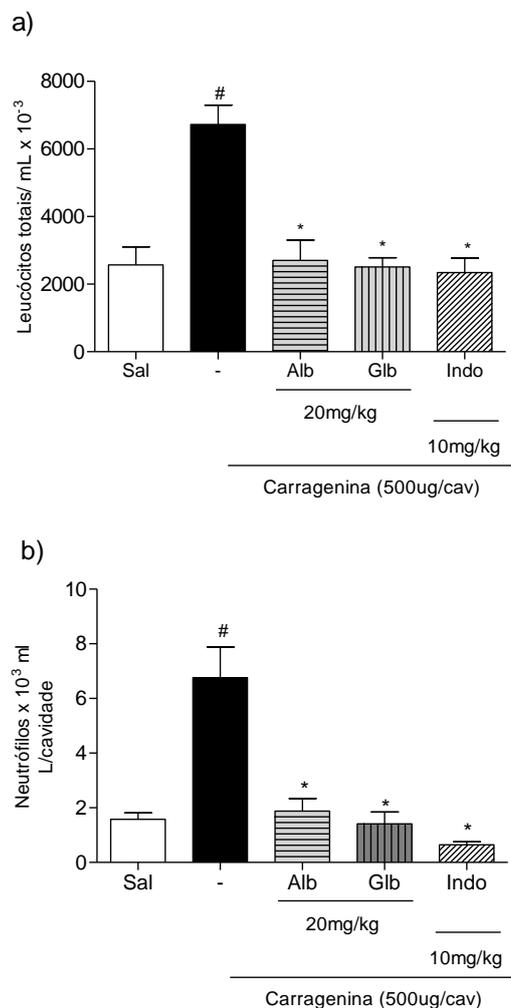


Figura 7. Efeito do tratamento com as frações Alb e Gib (20 mg/kg) de *Crotalaria rettusa* na migração celular induzida por carragenina no modelo de peritonite. **(a)** Contagem de leucócitos totais e **(b)** neutrófilos no fluido intraperitoneal foi feita quatro horas após a indução. Os valores foram dados como a média \pm E.P.M. (n = 5). # e * indica diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo salina ou carragenina, respectivamente (ANOVA seguida pelo teste de Newman–Keuls).

5.4 Potencial antinociceptivo

5.4.1 Contorções abdominais induzida por ácido acético

A administração por via i.p. da fração Gib (20mg/kg), 1 h antes do ácido acético 0,6%, reduziu significativamente o número de contorções abdominais induzidas por este estímulo. O número de contorções foi reduzido de $47.17 \pm$

7.98 (grupo salina) para 7.80 ± 3.81 (Glb), uma redução de 83,46%. A fração Alb também atenuou o número de contorções, contudo sem significância ($p > 0,05$). A morfina (5mg/kg; i.p.) inibiu significativamente o número por esse agente álgico (Figura 8).

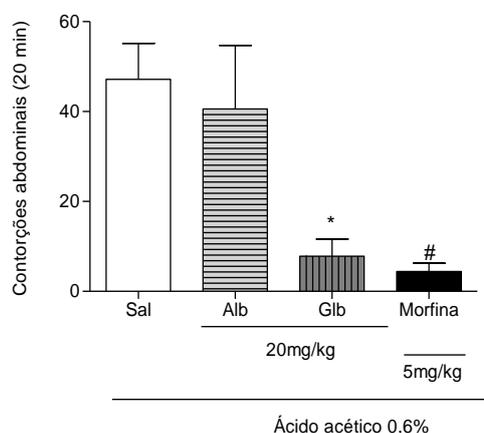


Figura 8. O efeito antinociceptivo de frações albumina e globulina de sementes de *Crotalaria retusa* em contorções induzidas pelo ácido acético. Os valores foram dados como a média \pm E.P.M. ($n = 5$). Morfina (5mg/kg, i.p.) foi usada como controle positivo para a inibição das contorções. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salino (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls).

5.4.2 Teste de formalina

No modelo de nocicepção induzida por formalina, os resultados mostram que as frações Alb ($61,00 \pm 6,173s$) e Glb ($41,00 \pm 8,075s$) (20mg/kg) administradas por via i.p. 1h antes da formalina, não foram capazes de reduzir o tempo de lambedura/mordedura da pata durante a 1ª fase do teste (0-5 min) em relação ao grupo controle ($57,00 \pm 9,503s$). Contudo, na 2ª fase (20-25 min) as frações Alb ($9,800 \pm 8,558s$) e Glb ($5,200 \pm 4,067s$), promoveram naqueles que foram pré-tratados, uma redução significativa do tempo de lambedura/mordedura em relação ao grupo controle ($103,8 \pm 14,97s$). A morfina (5mg/kg; i.p.), um analgésico opioide, diminuiu significativamente o tempo de lambedura/mordedura da pata em ambas as fases do teste (1ª fase: $19,15 \pm 5,025s$; 2ª fase: $4,167 \pm 3.582s$) (Figura 9).

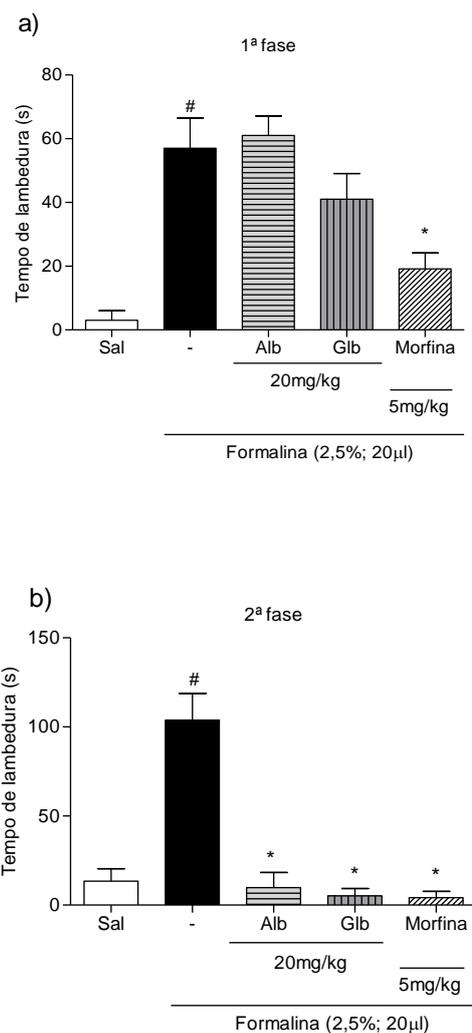


Figura 9. Efeito antinociceptivo das frações Alb e Glb de sementes de *Crotalaria retusa* no modelo de formalina. O tempo de lambedura foi cronometrado durante a **(a)** 1ª fase (0-5 min) e **(b)** 2ª fase (20-25 min). Cada coluna representa a média \pm E. P. M. ($n = 5$). A morfina foi utilizada como controle positivo para atividade antinociceptiva. # e * indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) quando comparados com a formalina (ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls).

5.5 Atividade hemaglutinante

As frações Alb e Glb foram avaliadas quanto à presença de lectinas através do ensaio de hemaglutinação, utilizando eritrócitos humanos de diferentes tipos (A, B, AB e O) em placas de microtitulação. Os resultados demonstram que ambas as frações foram capazes de promover aglutinação dos eritrócitos do sistema ABO. A fração albumina foi mais eficiente em promover aglutinação de hemácias do tipo O, enquanto que a fração globulina do tipo A. (Tabela 3).

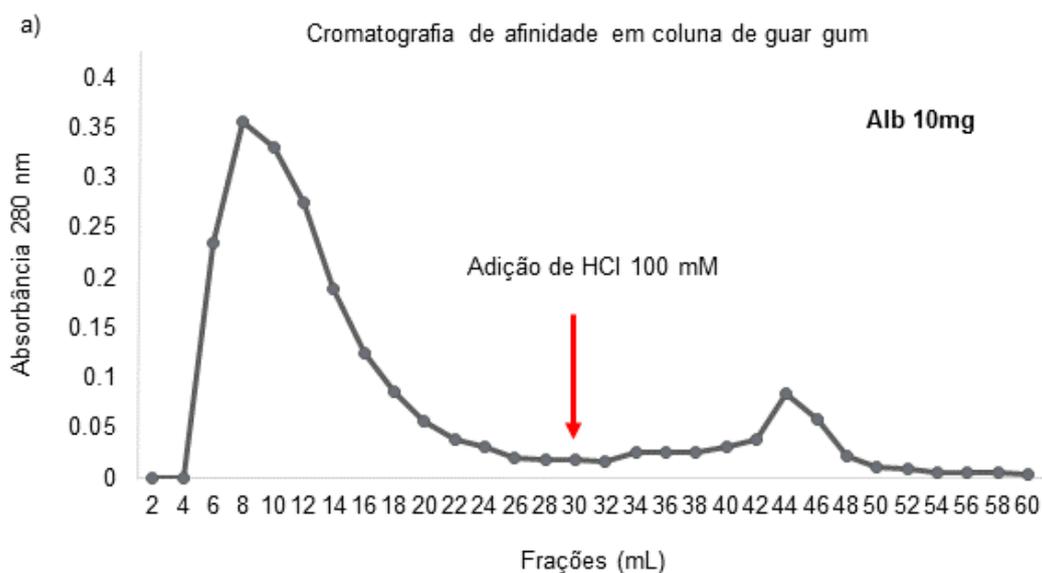
Tabela 3. Atividade hemaglutinante ($\mu\text{gP/UA}$) das frações proteicas de sementes de *Crotalaria retusa*.

Amostra	Tipo Sanguíneo			
	A	B	AB	O
Albumina	0,970	3,882	0,485	0,485
Globulina	0,048	1,529	1,529	0,382

A quantidade de proteínas solúveis foi determinada pelo método de Bradford (1976).

5.6 Cromatografia em coluna de guar gum

Com o objetivo de avançar no fracionamento de proteínas, as frações Alb e Glb foram submetidas à cromatografia de afinidade em coluna de guar gum. As análises dos perfis cromatográficos revelam a presença de picos retidos em ambas as frações (Figura 10).



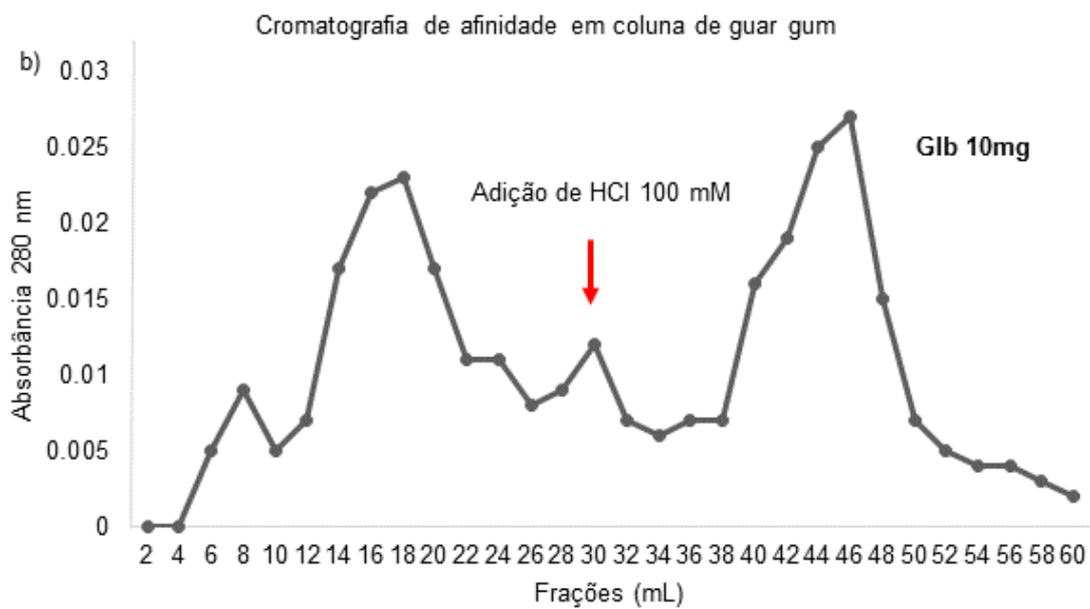


Figura 10. Cromatografia de afinidade em coluna de guar gum. A coluna foi previamente equilibrada com NaCl 150mM. A eluição do pl foi realizada com aplicação de uma solução com NaCl 150mM. A eluição do pII procedeu com aplicação de uma solução de HCl 100mM. Coleta de frações de aproximadamente 2 mL. Absorbância medida em espectrofotômetro em comprimento de onda igual a 280 nm. **(a)** Fração Alb (10mg) e **(b)** Fração Glb (10mg).

6. DISCUSSÃO

As sementes, órgãos vegetais responsáveis pela dispersão e perpetuação das plantas vasculares (SHEWRY et al., 1995; MORAES, 2007; JUDD et al., 2009), são fontes de diversas biomoléculas (SALES et al., 2000; SASAKI, 2008; SANDOVAL-OLIVEROS; PAREDES-LÓPEZ, 2012). Dentre elas, as proteínas possuem um lugar de destaque, atuando em diversos mecanismos fisiológicos, essenciais durante a ação catalítica das enzimas (metabolismo celular), mobilização de substâncias fundamentais para germinação, produção de matéria-prima para síntese de novas células e tecidos e nos mecanismos de defesa em respostas a fatores ambientais (bióticos e/ou abióticos) (SHEWRY et al., 1995; VASCONCELOS et al., 2004; CORTE et al., 2006; BARIANI et al., 2007; BARIANI et al., 2012; COSTA, 2012).

Foi realizada eletroforese SDS-PAGE para demonstração do perfil proteico das frações Alb e Glb obtidas a partir de sementes de *C. retusa*. A eletroforese em gel é certamente, entre as inúmeras técnicas conhecidas para a análise proteica, a mais versátil e facilmente executada e útil para a caracterização e separação de moléculas de acordo com sua massa molecular, (LOPES et al., 1984; PIMENTEL, 1988; MORAES et al., 2013). O padrão eletroforético (Figura 4) mostra que as frações Alb e Glb apresentam pelo menos quatro bandas proteicas, com massa molecular entre 21,1 a 64,0 Kda. Baseado na intensidade de coloração, a subunidade de massa molecular de aproximadamente 64,0 Kda parece ser a banda majoritária em ambas as frações, seguidas daquelas de média intensidade em torno de 32,0 Kda.

De acordo com dados disponíveis na literatura sobre proteínas vegetais provenientes de sementes e suas atividades biológicas (LEITE PEREIRA et al., 2011; ARAÚJO et al., 2013; PIRES et al., 2013; AL AKEEL et al., 2014; GIRÃO et al., 2015; LACERDA et al., 2015), as frações albumina e globulina obtidas a partir de sementes de *C. retusa*, foram avaliadas quanto as suas atividades anti-inflamatória e antinociceptiva utilizando modelos consagrados em camundongos para análises de tais atividades.

O edema é uma característica fundamental durante o processo inflamatório agudo, promovida pela vasodilatação, essencial para o aumento da

permeabilidade vascular, ao qual favorece o extravasamento de proteínas e leucócitos do espaço intra para o extravascular e o acúmulo deste no local inflamado (POSSADAS, et al., 2004; ALLER et al., 2007; FERREIRA et al., 2013).

O modelo de edema de pata induzido por carragenina é bastante utilizado na triagem de moléculas com atividade anti-inflamatória, bem como dos mecanismos envolvidos durante a inflamação (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962; POSADAS, et al., 2004; NECAS; BARTOSIKOVA; 2013). O edema induzido por esse agente edematogênico, trata-se de um evento bifásico, ocasionado pelo envolvimento de diferentes mediadores inflamatórios, que de maneira orquestrada, dão início à resposta inflamatória (VINEGAR; SCHREIBER; HUGO, 1969; FERREIRA et al., 2013).

A fase inicial (0-2 h) é uma resposta predominantemente vascular e atribuída à liberação de serotonina, histamina, bradicinina e substância P, seguida pela liberação de outros mediadores, destacando-se as citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico (fase tardia, 2-4 h). O pico da formação do edema ocorre a partir da 3ª hora, ocasionado pela intensa migração neutrofílica para o local de inflamação, com subsequente produção de espécies reativas de oxigênio e mediadores inflamatórios (DI ROSA; WILLOUGHBY, 1971; BARROS, et al., 2004; MA et al., 2013).

Os resultados obtidos no presente estudo, mostram que as frações proteicas, albumina e globulina, extraídas a partir de sementes de *C. retusa*, reduziram significativamente ($p < 0,05$) o edema de pata induzido por carragenina a partir da 2ª hora, com maior percentual de atividade anti-inflamatória para a dose de 20mg/kg (Alb e Glb) na segunda fase do edema (3-4h), mostrando que efeito anti-inflamatório é dose-depenente e sugerindo que elas atuem inibindo a migração leucocitária até ao sítio de inflamação. Mecanismo anti-inflamatório semelhante foi observado por uma proteína isolada de sementes de *Bauhinia bauhinioides*, ao qual inibiu significativamente o edema induzido por carragenina (GIRÃO et al., 2015).

As frações albumina e globulina também foram desafiadas a inibirem o edema induzido por dextrana, um polissacarídeo capaz de induzir inflamação pela liberação de histamina e serotonina, ocasionada pela degranulação de

mastócitos (MOODLEY; MONGAR; FOREMAN, 1982; KATZ et al., 1984). Este agente causa um edema osmótico, com acentuada elevação da permeabilidade vascular e baixas concentrações de proteínas e neutrófilos (LO; ALMEIDA; BEAVEN, 1982). De acordo com os resultados obtidos (Figura 6), sugere-se que a atividade anti-inflamatória das frações Alb e Glb das sementes de *C. retusa*, atuem em vias de resposta inflamatória diferente daquela induzida por dextrana, como por exemplo vias de indução da migração celular.

A hipótese de que ação anti-inflamatória das frações esteja associada com a inibição de migração celular, é reforçada pelos resultados da quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na pata dos animais. A MPO, uma hemoproteína localizada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, é classicamente utilizada como marcador bioquímico para mensurar indiretamente a migração de neutrófilos até ao sítio de inflamação, visto que, a redução de sua concentração reflete a diminuição na intensidade da atividade inflamatória (BRADLEY et al., 1982; SALVEMINI et al., 1996; DOS SANTOS et al., 2013). Nossos resultados demonstraram que a administração de carragenina induziu uma intensa atividade da enzima MPO na pata dos camundongos, ao qual foi inibida significativamente pelo pré-tratamento com as frações Alb e Glb (20mg/kg).

Estes dados foram reforçados pelos resultados obtidos no modelo de peritonite induzido por carragenina. Este modelo é amplamente utilizado na investigação de moléculas com ação anti-inflamatória. Este ensaio analisa o influxo leucocitário para a cavidade peritoneal dos animais pela contagem total e diferencial dessas células (DI ROSA; WILLOUGHBY, 1971; BARROS et al., 2004).

A indução de peritonite por carragenina estimula células residentes, macrófagos e mastócitos (principalmente macrófagos), a produzirem e liberarem uma série de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) e outros mediadores inflamatórios, que atuam como quimiotáticas de leucócitos, estimulam a migração destas células até o foco inflamatório, além de elevar a permeabilidade e expressão de moléculas de adesão endoteliais (selectinas e integrinas), dessa forma, intensificando a migração celular. Outra característica desse modelo é a redução dos níveis de citocinas anti-inflamatória como a IL-10

(DINARELLO, 1984; AGGARWAL; NATARAJAN, 1996; ZHANG et al., 2001; RANG et al., 2007; QUEIROZ et al., 2010).

Os resultados obtidos (Figura 7) revelaram que o pré-tratamento dos animais com as frações Alb e Glb (20mg/kg) inibiram a migração de leucócitos, especialmente neutrófilos, para cavidade peritoneal dos animais, reforçando que a atividade anti-inflamatória destas frações, envolva vias de inibição de migração leucocitária. Além disso, estas frações poderiam estimular a produção citocinas anti-inflamatórias (IL-10), bem como, bloquear a liberação e produção das pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α). Nos estudos realizados por Silva et al., (2013a) e Girão et al., (2015), proteínas obtidas de semente de *Parkia biglobosa* e *B. bauhinoides* apresentaram ação similar ao do presente estudo, inibindo a migração de neutrófilos no modelo de peritonite induzida por carragenina.

Durante a resposta inflamatória ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, que por sua vez, acabam por ativar diretamente os nociceptores periférico, e após ativação constante ou repetitiva desses, as fibras aferentes produzem substâncias que culmina na ativação das vias neurogênicas centrais, com subsequente desenvolvimento da sensação dolorosa (KIDD; URBAN, 2001; ZHANG; AN, 2007). Assim, como é observada uma estreita relação entre o processo inflamatório e a dor, as frações Alb e Glb foram analisadas quanto à presença de atividade antinociceptiva nos modelos de contorções abdominais por ácido acético e formalina.

O modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, induz nocicepção do tipo inflamatória visceral pela irritação do peritônio, desencadeando torção do tronco e extensão dos membros inferiores (COLLIER et al., 1986; LE BARS; GONZARIU; CADDEN, 2001). Mesmo não sendo um teste específico, tal modelo é classicamente utilizado na triagem de substâncias com atividades nociceptivas e inflamatórias de ação periférica e/ou central (COLLIER et al., 1968; LE BARS; GONZARIU; CADDEN, 2001; IKEDA et al., 2001; CHANG et al., 2010; GAWADE, 2012). A atividade nociceptiva desse teste ocorre pela ativação de macrófagos e mastócitos, com subsequente liberação de citocinas pró-inflamatórias, resultando em uma hiperalgesia. Além do mais, há liberação de mediadores inflamatórios como bradicinina, substância P e prostaglandinas (RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001; GAWADE, 2012),

que por sua vez, estimulam os neurônios aferentes primários pela liberação de neurotransmissores no corno dorsal e subsequente estimulação nociceptiva em nível central (RIBEIRO et al., 2000; FENG; CUI; WILLIS, 2003). O ácido acético também provoca nocicepção através da dissociação de prótons contidos no próprio ácido, estimulando diretamente os canais de cátions não seletivos encontrados nos neurônios aferentes primários, causando a dor visceral (IKEDA et al., 2001).

De acordo com os resultados, a fração Alb (20mg/kg) não foi capaz de reduzir o número de contorções induzida por ácido acético de maneira significativa. Por outro lado, a fração Glb (20mg/kg) reduziu significativamente tais contorções induzidas por esse agente álgico (Figura 8). Os dados obtidos sugerem que a ação antinociceptiva desta fração possa está associada a inibição de citocinas pró-inflamatórias, bem como de mediadores inflamatórios. Efeito antinociceptivo semelhante foi observada por uma proteína de sementes de *P. biglobosa* (SILVA et al., 2013a).

Para confirmar a atividade analgésica das frações Alb e Glb, foi conduzido o teste nociceptivo induzido por formalina 2,5%. Este ensaio é um método de análise comportamental aplicada para mensurar a eficácia de agentes antinociceptivos, onde dois tipos diferentes de dor (neurogênica e inflamatória) podem ser avaliadas, além de esclarecer o mecanismo de analgesia do agente testado (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989; RANDOLPH; PETERS, 1997; SILVA et al., 2013b).

As respostas a esse agente álgico seguem um padrão bifásico. A primeira fase (0-5 min) trata-se de uma dor do tipo neurogênica ou aguda (dor central), iniciando concomitantemente à injeção de formalina, estando associada à estimulação química direta dos nociceptores, e liberação de mediadores químicos como substância P, glutamato e bradicinina (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989). A segunda fase (20-25 min) ou fase inflamatória, estar relacionada com inflamação local, desencadeada pela liberação ou formação de inúmeros mediadores inflamatórios como citocinas, prostaglandinas, histamina, serotonina e bradicinina (DUBUISSON; DENNIS, 1978; HUNSKAAR; HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989; TJØLSEN et al., 1992).

De acordo com os resultados obtidos neste ensaio, o pré-tratamento dos animais com as frações Alb e Glb (20mg/kg) de semente de *C. retusa* mostrou-se efetivas em inibir significativamente o tempo de lambedura/mordeduras durante a fase inflamatória, demonstrando a existência de efeito analgésico dessas frações. Esta atividade antinociceptiva pode estar associada com a inibição da ação de mediadores inflamatórios como a serotonina, bradicinina, histamina, prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias.

Em nosso trabalho, foi verificado que as frações proteicas Alb e Glb, apresentaram atividade hemaglutinante contra todos os eritrócitos humanos testados (A, B, AB e O), com maior atividade hemaglutinante para a fração Glb. Esta fração mostrou maior especificidade por eritrócitos do grupo sanguíneo A, sugerindo que ela apresente afinidade por carboidratos do tipo *N*-acetil-D-galactosamina (KHANG; JEAN-LUC; JOHAN, 1990). Já a fração Alb apresentou maior afinidade por hemácias do grupo sanguíneo O, mostrando afinidade por carboidratos do tipo α -L-fucose (SHARON; LIS, 1987). A presença de atividade hemaglutinante sugere a presença de lectinas nas frações (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

As lectinas, são proteínas que possuem pelo menos um domínio não-catalítico, com capacidade de ligar-se reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo específico, sendo capazes de aglutinar células, dentre elas, eritrócitos (LIS; SHARON, 1986; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; ASSREUY et al., 1999). A ação anti-inflamatória dessas proteínas pode estar associada ao domínio de ligação a carboidrato ou domínio lectínico, que por sua vez, impede a adesão dos leucócitos às células do endotélio (ASSREUY et al., 1997; ALENCAR et al., 1999). Embora fraca e reversível, essa interação é capaz de retardar a transmigração dos leucócitos ao sítio inflamado (McEVER, 1991; McEVER, 1992; LASKY, 1992; ASSREUY et al., 1999; ROCHA et al., 2011).

Essas proteínas apresentam afinidade por moléculas adesivas (selectinas) pertencentes a uma família de glicoproteínas transmembrana, com capacidade de ligação a carboidratos. A família de selectinas consiste de três moléculas de superfície (E, P e L-selectinas) intimamente relacionadas (NELSON et al., 1993; TEDDER et al., 1995). As L-selectinas são aquelas expressas na superfície de leucócitos e as E- e P-selectinas corresponde

aquelas expressas por células endoteliais. A afinidade das lectinas às selectinas, principalmente as E- e P-selectinas, é fundamental na resolução do processo inflamatório, ao qual, impede a ligação dos leucócitos a essas moléculas adesivas, dessa maneira, reduzindo a capacidade de captura dos leucócitos e rolamento destes na superfície das células endoteliais e conseqüentemente inibindo a transmigração leucocitária até o foco inflamatório (BOSSE; VESTWEBER, 1994; TEDDER et al., 1995; VESTWEBER; BLANKS, 1999; MULLER, 2013).

Com intuito de purificação de uma possível lectina presentes nas frações Alb e Glb de sementes de *Crotalaria retusa*, foi realizada cromatografia por afinidade em coluna de guar gum. A cromatografia por afinidade utiliza a capacidade de determinadas proteínas em se ligar especificamente em um certo ligante (BIOTECH, 2007). Por esse método, de acordo com as análises dos perfis cromatográficos, pode-se observar picos, estes sugerem a presença de lectina, uma vez que, elas apresentam afinidade por carboidratos constituintes à coluna. A fração Alb exibiu uma maior afinidade pelos carboidratos presentes à coluna, visto que, houve a presença de pico não retido (pI) e um pico retido (pII), diferentemente da fração Glb que não foi possível notar tais picos.

A ação anti-inflamatória das frações proteicas Alb e Glb da semente de *C. retusa*, pode estar relacionada a presença de lectinas, pois elas são conhecidas em inibir a migração neutrofílica e subsequente, o processo inflamatório. A proposta da participação de lectinas presentes nas frações Alb e Glb na ação anti-inflamatória observada, corrobora com dados da literatura, onde lectinas isoladas a partir de sementes de *Dioclea grandiflora*, *D. violácea*, *D. virgata*, *Vaitarea macrocarpa*, *Lonchocarpus sericeus* e *Gratylia floribunda*, inibiram a migração de neutrófilos induzida pela administração de carragenina (ASSREUY et al., 1997; ALENCAR et al., 1999; NAPIMOGA et al., 2007).

7. Conclusões

No presente trabalho, a análise do perfil eletroforético mostram que as frações Alb e Glb apresentam pelo menos quatro bandas com peso molecular na faixa de 21,1 a 64,0 kDa.

Essas frações apresentaram atividade antiedematogênica ao inibir o edema induzido por carragenina, sugerindo que essas frações atuem por via de inibição da migração celular, corroborado e reforçado pelos resultados da quantificação da atividade da enzima MPO e pela redução da contagem de leucócitos, principalmente neutrófilos, no modelo de peritonite. Além disso, os ensaios nociceptivos mostram a ação antinociceptiva das mesmas.

Por fim, a análise da atividade hemaglutinante e do perfil cromatográfico das frações Alb e Glb, apontam a presença de lectinas, dessa forma, sugerindo que as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva estejam associadas a presença dessa proteína.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B. B.; NATARAJAN, K. Tumor necrosis factors: Developments during the last decade. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 7, p. 93–124, 1996.

AHMAD, A. et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 5, p. 337-352, 2013.

AL AKEEL, R. et al. Evaluation of antibacterial activity of crude protein extracts from seeds of six different medical plants against standard bacterial strains. **Saudi journal of biological sciences**, v. 21, n. 2, p. 147-151, 2014.

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, n. 2, p. 107-113, 1999.

ALLER, M. A. et al. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical hypotheses**, v. 68, n. 1, p. 202-209, 2007.

ALVEY, L.; HARBERD, N. P. DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs? **Physiologia Plantarum**, v. 123, n. 2, p. 153-160, 2005.

AMDEKAR, S. et al. Anti-inflammatory activity of lactobacillus on carrageenan-induced paw edema in male wistar rats. **International journal of inflammation**, v. 2012, 2012.

ARAÚJO, T. S. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of chitin-binding lectin from *Canna limbata* seeds. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 171, n. 8, p. 1944-1955, 2013.

AREMU, M. O.; BAMIDELE, T. O.; AMOKAHA, J. A. Compositional Studies of Rattle Box (*Crotalaria retusa* L.) Seeds Found in Nasarawa State, Nigeria. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 11, n. 10, p. 880-885, 2012.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, p. 385-406, 2012.

ASSREUY, A. M. S. et al. Anti-inflammatory effect of glucose—mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of inflammation**, v. 6, n. 3, p. 201-210, 1997.

AUSUBEL, Frederick M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? **Nature immunology**, v. 6, n. 10, p. 973-979, 2005.

BARBOSA, P. P. et al. Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. **Biochemistry research international**, v. 2011, 2011.

BARIANI, A. et al. Análise do Perfil Proteico e da Atividade Hemaglutinante no Extrato total de Sementes de *Peltogyne venosa*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. pg. 207-209, 2007.

BARIANI, A. et al. Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos proteicos sobre fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 2, p. 131-138, 2012.

BARRETO, R.A. et al. O alcaloide monocrotalina, extraído de *Crotalaria retusa*, altera a expressão de GFAP, a morfologia e o crescimento de culturas primárias de astrócitos. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 7, p. 112–127, 2006.

BARRIO, D. A.; AÑÓN, M. C. Potential antitumor properties of a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*. **European journal of nutrition**, v. 49, n. 2, p. 73-82, 2010.

BARROS, F. E. V. et al. Avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico de *Calotropis procera*, r. br.(Ciúme). **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 16, n. 9/10, p. 60-64, 2004.

BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 2, p. 413, 2008.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BERLINCK, R. G. S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v.64, n.3, 2012.

BERNHOF, A. A brief review on bioactive compounds in plants. **Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals**, 2010.

BESSA, N. G. F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 15, n. 4, supl. 1, p. 692-707, 2013.

BIOTECH, Amersham Pharmacia. Affinity Chromatography: Principles and Methods (handbook). **Biotech UK Limited**, 2007.

BORGES, J. T. et al. Características físico-químicas, nutricionais e formas de consumo da quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Temas agrários**, v. 15, n. 1, 2010.

BOSSE, R.; VESTWEBER, D. Only simultaneous blocking of the L-and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum. **European journal of immunology**, v. 24, n. 12, p. 3019-3024, 1994.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, pp.248-254, 1976.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRANDÃO, Hugo N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRITANNICA ACADEMIC. "Inflammation". Disponível em: <<http://academic.eb.com/EBchecked/topic/287677/inflammation>>. Acesso em: 02 de jun. de 2015.

CAMPOS, D. C. O. **Isolamento de um princípio ativo de natureza proteica de sementes de *Moinda citrifolia* L. com potencial para alívio da inflamação e dor.** 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza – CE.

CARVALHO, I. F. **Atividade antinociceptiva, em dores agudas, de um novo fator opióide da secreção cutânea de *Rhinella schneideri*.** 2008. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza – CE.

CHANDRA, S.; RAWAT, D. S. Medicinal plants of the family Caryophyllaceae: a review of ethno-medicinal uses and pharmacological properties. **Integrative Medicine Research**, v. 4, n. 3, p. 123-131, 2015.

CHANG, Heng-Yuan et al. Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammation of hispolon in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2010.

CHATTERJEE, N. et al. Exploring the anti-inflammatory activity of a novel 2-phenylquinazoline analog with protection against inflammatory injury. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 264, n. 2, p. 182-191, 2012.

CHEVREUIL, L. R. et al. Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em sementes de leguminosas arbóreas da amazônia. **Acta amaz**, v. 39, n. 1, p. 199-206, 2009.

CHIN, Y. W. et al. Drug discovery from natural sources. **The AAPS journal**, v. 8, n. 2, p. E239-E253, 2006.

CIACCIA, L. "Fundamentals of Inflammation." **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v.84 n.1, p. 64-65, 2011.

CIFUENTES SÁNCHEZ, D. C. **Evidências clínico-patológicas de ovinos intoxicados experimentalmente com sementes de *Crotalaria spectabilis* (Leg.papilionoidea).** 2011. xiii, 50 f. Dissertação (mestrado) - Universidade

Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/89205>>.

COLLIER, H. O. J. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

CORDEIRO, S. L. **Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de uma fração rica em heterogalactana sulfatada extraída da alga *Codium isthmocladum* (Vickers 1905)**. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal – RN.

COSTA, C. J.; ZIMMER, P. D.; VILLELA, F, A. Base celular da origem e desenvolvimento do endosperma. **Rev. Cient. Rural**, Bagé, v. 13, n.1, p. 226-246. ago 2011.

COSTA, T. G. **Prospecção de extratos de plantas do bioma cerrado com potencial biotecnológico e isolamento de albumina 2S**. Brasília-DF, 2012. 104 f. (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília. 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. The A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p.47-58, 2010.

CORTE, V. B. et al. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 941-949, Dec. 2006 .

COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 13-23, 2006.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

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

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. bras. reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DA TRINDADE NOBRE, V. M. *et al.* Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em Equídeos no semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 3, p. 132-143, 2004.

- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, p. 125-131, 1995.
- DE LUCCA, A. J; CLEVELAND, T. E.; WEDGE, D. E. Plant-derived antifungal proteins and peptides. **Canadian journal of microbiology**, v. 51, n. 12, p. 1001-1014, 2005.
- DE MEJÍA, E. G.; PRISECARU, V. I. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 45, n. 6, p. 425-445, 2005.
- DE OLIVEIRA, C. F. R.; MACEDO, M. L. Emprego de inibidores de protease vegetais como ferramenta biotecnológica alternativa no controle de pragas. **Biológicas & Saúde**, v. 1, n. 1, 2011.
- DE SOUZA, T.; OLIVEIRA, D.; SALES, E. Prospecção Tecnológica: Moléculas Bioativas Derivadas De Produtos Naturais. **GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias**, 3, dez. 2013.
- DEVENDRA, B. N.; SRINIVAS, N.; SOLMON, K. S. A comparative pharmacological and phytochemical analysis of in vivo & in vitro propagated *Crotalaria* species. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** (2012)37-41.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 4, p.303-336, 16 abr. 2012.
- DINARELLO, C. A. Interleukin 1 as mediator of the acute-phase response. **Immunologic Research**, v. 3, n. 1, p. 29-33, 1984.
- DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A. Screens of anti-inflammatory drugs. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.23, n.4, p.297-8, 1971
- DOS SANTOS, D. S. et al. Utilização de um modelo experimental para estudo sobre o toque terapêutico. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 21, n. 1, p. 442-449, 2013.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1978.
- EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, p. 385-393, 1953.
- EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 3, p. 514-525, 2007.
- FABRE, C. et al. Characterization and sugar-binding properties of arcelin-1, an insecticidal lectin-like protein isolated from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. RAZ-2) seeds. **Biochem. J**, v. 329, p. 551-560, 1998.

FALCÃO, H. S. *et al.* Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 381-391, 2005.

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W. D. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **ANESTHESIOLOGY-PHILADELPHIA THEN HAGERSTOWN-**, v. 98, n. 3, p. 729-733, 2003.

FENNER, R. *et al.* Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Braz J Pharm Sci**, v. 42, p. 369-394, 2006.

FERREIRA, L. C. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 100-108, 2013.

FERRIZ-MARTINEZ, R. A. *et al.* The role of plant lectins in cancer treatment. **Nova Sci**, p. 71-90, 2010.

FOGLIO, M. A. *et al.* Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multi Ciência**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FRANCO, E.A.P.A.; BARROS, R.F.M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.3, p.78-88, 2006.

FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 269-279, Apr. 2010.

FU, X. *et al.* The Arabidopsis mutant sleepy1gar2-1 protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCFSLY1 E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. **The Plant Cell**, v. 16, n. 6, p. 1406-1418, 2004.

FULDA, S.; EFFERTH, T. Selected Secondary Plant Metabolites for Cancer Therapy. **World Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 1, n. 1, p. 24–28, 2015.

GARCIA, J. M. *et al.* O gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae, Crotalariaeae) na Planície de Inundação do Alto Rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, 2013.

GAWADE, S. P. Acetic acid induced painful endogenous infliction in writhing test on mice. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 3, n. 4, p. 348, 2012.

GIRÃO, D. K. F. B. *et al.* The galactose-binding lectin isolated from *Bauhinia bauhinioides* Mart seeds inhibits neutrophil rolling and adhesion via primary cytokines. **Journal of Molecular Recognition**, v. 28, n. 5, p. 285-292, 2015.

GUZMÁN-RODRÍGUEZ, J. J. *et al.* Plant Antimicrobial Peptides as Potential Anticancer Agents. **BioMed Research International**, 2014.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HERMAN, E. M.; LARKINS, B. A. Protein storage bodies and vacuoles. **The Plant Cell**, v. 11, n. 4, p. 601-613, 1999.

HOLANDA, F. R. et al. Antinociceptive activity of lectins from Diocleinae seeds on acetic acid-induced writhing test in mice. **Protein and peptide letters**, v. 16, n. 9, p. 1088-1092, 2009.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HONÓRIO JÚNIOR, E. R. et al. Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 453–458, Julho, 2010.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

HUYNH, Q. K. et al. Antifungal proteins from plants. Purification, molecular cloning, and antifungal properties of chitinases from maize seed. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 10, p. 6635-6640, 1992.

JAMKHANDE, P. G.; WATTAMWAR, A. S. *Annona reticulata* Linn. (Bullock's heart): Plant profile, phytochemistry and pharmacological properties. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 5, n. 3, p. 144-152, 2015.

IKEDA, Y. et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life sciences**, v. 69, n. 24, p. 2911-2919, 2001.

JI, H.F.; LI, X.J.; ZHANG, H.Y. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? **EMBO Reports**. 2009;10(3):194-200.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2009. p. 78-79, 625 p.

KATZ, L. B. et al. Characterization of the enhanced paw edema response to carrageenan and dextran in 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 230, n. 3, p. 670-677, 1984.

KELLEY, L. C. et al. Traversing the basement membrane in vivo: a diversity of strategies. **The Journal of cell biology**, v. 204, n. 3, p. 291-302, 2014.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. PATOFISIOLOGIA DA DOR (Pathophysiology of pain). **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, n. 1, p. 3-11, 2001.

KUMAR, S.; MALHOTRA, R.; KUMAR, D. Euphorbia hirta: Its chemistry, traditional and medicinal uses, and pharmacological activities. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 7, p. 58, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran. **Patologia – bases patológicas das doenças**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 29-52, 1480 p.

KUMAR, V. et al. Natural Compounds from Algae and Spirulina platensis & its Antimicrobial Activity. **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 3, n. 3, p. 212–223, 2013.

LABOURIAU, L. F. G. O interesse do estudo das sementes. **Estud. av.**, São Paulo, v. 4, n. 9, p. 228-242, Aug. 1990.

LACERDA, R. R. et al. Lectin isolated from Brazilian seeds of velvet bean (*Mucuna pruriens* (L) DC.) presents analgesic, anti-inflammatory and antihemolytic action. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 8, p. 231-242, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LASKY, L. A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. **Science**, v. 258, n. 5084, p. 964-969, 1992.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LEITE PEIREIRA, M. et al. Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds with potential to relieve pain and inflammation. **Protein and peptide letters**, v. 18, n. 11, p. 1078-1085, 2011.

LEY, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. **Immunological reviews**, v. 186, n. 1, p. 8-18, 2002.

LIAO, J. C. et al. Anti-inflammatory activity of N-(3-florophenyl) ethylcaffeamide in mice. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 8, p. 15199-15211, 2013.

LIBBY, P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. **Nutrition reviews**, v. 65, n. suppl 3, p. S140-S146, 2007.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annual review of biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 35-67, 1986.

LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 221, n. 1, p. 261-267, 1982.

MA, Y. *et al.* Anti-inflammatory effects of 4-methylcyclopentadecanone on edema models in mice. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 12, p. 23980-23992, 2013.

MACEDO, M. L. R. *et al.* Novel protein from *Labramia bojeri* A. DC. seeds homologue to Kunitz-type trypsin inhibitor with lectin-like properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 25, p. 7548-7554, 2004.

MACEDO, M. L. R. *et al.* Talisia esculenta lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1571, n. 2, p. 83-88, 2002.

MALING, H. M. *et al.* Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 191, n. 2, p. 300-310, 1974.

MARCHAND, S. The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 34, n. 2, p. 285-309, 2008.

MARCOS-FILHO, J. Importância do potencial fisiológico da semente de soja¹. **Informativo ABRATES**, v. 23, p. 21-23, 2013.

MASKREY, B. H. *et al.* Mechanisms of Resolution of Inflammation A Focus on Cardiovascular Disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 5, p. 1001-1006, 2011.

MATOS, D. C. **Estudo comparativo da atividade antiinflamatória e anti-tumoral de proteínas inativadoras de ribossomos extraídas de plantas.** 2008. 148 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) Universidade Estadual Paulista – UNESP – Araraquara – SP.

McCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life sciences**, v. 78, n. 5, p. 476-484, 2005.

McEVER, R. P. Leukocyte—endothelial cell interactions. **Current opinion in cell biology**, v. 4, n. 5, p. 840-849, 1992.

McEVER, R.P. Leukocyte interactions mediated by selectins. **Thromb Haemost**, v. 66, p. 80-87, 1991.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MELLO, E. O. **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MECANISMO DE AÇÃO DA DEFENSINA**. 2010. 76 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 2010.

MEOTTI, F. C. **Análise dos mecanismos de ação antinociceptiva e anti-inflamatória do flavonoide miricitrina: estudos *in vivo* e *in vitro***. 2006. 156 f. Tese (Doutorado Bioquímica e Toxicologia) Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – RS.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug Discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46: 4769-4807, 2011.

MOLINARI, G. Natural Products in Drug Discovery: Present Status and Perspectives. **Pharmaceutical Biotechnology Advances in Experimental Medicine and Biology**. Volume 655, pp 1327, 2009.

MOODLEY, I.; MONGAR, J. L.; FOREMAN, J. C. Histamine release induced by dextran: the nature of the dextran receptor. **European journal of pharmacology**, v. 83, n. 1, p. 69-81, 1982.

MORAES, J. V. **Morfologia e germinação de sementes de poecilanthe parviflora bentham (fabaceae-faboideae)**. 2007. 88 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

MOREIRA, V. S. **Atividade antioxidante e caracterização físico-química de variedades de urucueiros in natura e encapsulado**. Itapetinga–BA: UESB, 2013. 87p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

MULLER, M.; HOBIGER, S.; JUNGBAUER, A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 987-996, 2010.

MULLER, W. A. Getting leukocytes to the site of inflammation. **Veterinary Pathology Online**, v. 50, n. 1, p. 7-22, 2013.

NAPIMOGA, M. H. et al. *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **International immunopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 824-835, 2007.

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

- NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 4, p. 187-205, 2013.
- NEHETE, J. Y. *et al.* Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. **Pharmacognosy reviews**, v. 7, n. 14, p. 107, 2013.
- NELSON, R. M. *et al.* Heparin oligosaccharides bind L-and P-selectin and inhibit acute inflammation. **Blood**, v. 82, n. 11, p. 3253-3258, 1993.
- NEUKOM, H. Galactomannans: Properties and Applications. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 22, n. 2, p. 41-45, 1989.
- NOVA, N. S. V. **Alternativas Fitoterápicas Para O Tratamento Da Leishmaniose**. 2012. 148 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Veterinária. Universidade Estadual do Ceará. 2012.
- OKIN, D.; MEDZHITOV, R. Evolution of inflammatory diseases. **Current Biology**, v. 22, n. 17, p. R733-R740, 2012.
- LOLADE, Z.S.; OLAWORE, N.O.; OLADOSU, I.A. Phytochemistry and Therapeutic Potentials of the Seed Essential Oil of *Eucalyptus maculata* Hook from Nigeria. **Organic Chemistry: Current Research**. v. 2. 2013.
- OLSNES, S.; PIHL, A. Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis. **European Journal of Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 179-185, 1973.
- OSBORNE, T. B. *The vegetable Protein*. Longmans, Green, London. 1924.
- PAN, S. Y. *et al.* New perspectives on innovative drug discovery: an overview. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 3, p. 450-471, 2010.
- PATEL, N. B. Physiology of pain. **Guide to pain management in low-resource settings**, p. 13, 2010.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, no 4, 2012.
- PESKE, S.T.; ROSENTHAL, M.; ROTA, G. (Ed.) **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: UFPel, p. 416, 2003.
- PETROVSKA, B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p.1-5, 2012.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347, 1995.

PINTO, L. S. et al. Caracterização química e bioquímica de sementes de de sementes de Bauhinia v Bauhinia v Bauhinia variegata L. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, n. 3, p. 385-390, 2005.

PINTO, M. S. T.; RIBEIRO, J. M.; DE OLIVEIRA, E. A. G. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 2, 2011.

PIORNEDO, R. R. **Atividade antiinflamatória de *Gochnatia polymorpha ssp. floccosa* em camundongos**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.

PIRES, A. F. **Atividade antinociceptiva de uma lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* MART**. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza – CE.

PIRES, F. A. et al. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 201-209, 2013.

PITANGA, B. P. S. **AVALIAÇÃO DA NEUROTOXICIDADE DO ALCALÓIDE MONOCROTALINA EXTRAÍDO DE *Crotalaria retusa* L. (FABACEAE) EM CO-CULTURA NEURÔNIO/GLIA**. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos). Universidade Federal da Bahia.

POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.

PULLAMSETTI, S. S. et al. Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 1, p. 7-14, 2011.

QUEIROZ, G. R. et al. Intoxicação espontânea por *Crotalaria incana* em bovinos no norte do estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 823–832, 2013.

QUEIROZ, L. S.; NASCIMENTO, M. S.; CRUZ, A. K.; CASTRO, A. J.; MOURA MDE, F.; BASEIA, I. G.; ARAUJO, R. M.; BENEVIDES, N. M.; LIMA, L. F.; LEITE, E. L. Glucans from the *Caripia montagnei* mushroom present anti-inflammatory activity. **Int Immunopharmacol**, v. 10, n. 1, p. 34-42, 2010.

RADHAKRISHNAN, R.; RANJITHAKUMARI, B. D. Changes in protein content in micropropagated and conventional soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr.). **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 2, p. 186-189, 2009.

RAJ, L. J. M. et al. Phylogenetic relationships of *Crotalaria* species based on seed protein polymorphism revealed by SDS-PAGE. **Plant Science**, v. 2, n. 5, p. 119–128, 2011.

RAHMAN, A. H. M. M.; PARVIN, M. I. A. Study of Medicinal Uses on Fabaceae Family at Rajshahi, Bangladesh. **Research in Plant Sciences**, v. 2, n. 1, p. 6–8, 23 jan. 2014.

RAMANA, K.V.; SINGHAL, S.S.; REDDY, A.B. Therapeutic Potential of Natural Pharmacological Agents in the Treatment of Human Diseases. **BioMed Research International**. 2014.

RANDOLPH, B. C.; PETERS, M. A. Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. **Anesthesia progress**, v. 44, n. 1, p. 11, 1997.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**, 6^a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2007.

READY, L. B.; EDWARDS, W. T. Management of acute pain: a practical guide. Task Force on Acute Pain, **International Association for the Study of Pain**. 1992.

RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

RIVILLAS-ACEVEDO, L. A.; SORIANO-GARCÍA, M. Isolation and biochemical characterization of an antifungal peptide from *Amaranthus hypochondriacus* seeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10156-10161, 2007.

ROCHA, T. L. et al. Efeito nematocida de extratos aquosos de sementes de plantas sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Comunicado técnico 144**. 2006.

RODRIGUES, N. V. F. C. **Estudo da atividade anti-inflamatória da lectina de sementes de *Lonchocarpus araripensis* Benth.** 2012. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

SACCARO JUNIOR, N. L. Desafios da bioprospeção no Brasil. Brasília: IPEA, 2011. 8p.

SALAS, C. E. et al. Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

SALEM, M. L. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. **International immunopharmacology**, v. 5, n. 13, p. 1749-1770, 2005.

SALES, M. P. et al. Do Legume Storage Proteins Play a Role in Defending Seeds against Bruchids? **Plant Physiology**, v.124, n. 2, p. 515–522, 2000.

SANDOVAL-OLIVEROS, M. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 1, p. 193-201, 2012.

SASAKI, M. **Lipídios, carboidratos e proteínas de sementes de leguminosas do Cerrado**. 2008. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SCHUSSHEIM, Y. et al. Anti-inflammatory effects of peptide fragments of H2A histone and *Oryza Sativa Japonica* protein. **Peptides**, v. 32, n. 1, p. 125-130, 2011.

SCOTT, A. et al. What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus?. **British journal of sports medicine**, v. 38, n. 3, p. 248-249, 2004.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2883-2894, 2001.

SELS, Jan et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 941-950, 2008.)

SHARON, N.; LIS, H. A century of lectin research (1888–1988). **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, p. 488-491, 1987.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **The plant cell**, v. 7, n. 7, p. 945, 1995.

SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.

SILVA, H. C. et al. Purification and primary structure of a mannose/glucose-binding lectin from *Parkia biglobosa* Jacq. seeds with antinociceptive and anti-inflammatory properties. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, n. 10, p. 470-478, 2013a.

SILVA, J. A.; RIBEIRO-FILHO, N. P. A dor como um problema psicofísico. **Revista Dor**, v. 12, n. 2, p. 138-151, 2011.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 94, p. 18-23, 2013b.

SILVA-LÓPEZ, R. E. S.; PACHECO, J. S. Genus *Crotalaria* L. (Leguminosae). **Revista Fitos Eletrônica**, v. 5, n. 03, 2013.

SOBRINHO, T. J. S. P. **Estudo químico e biológico de espécies do gênero *Cnidocolus* presentes no ecossistema caatinga com potencial atividade terapêutica**. 2011. 113 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SONI, P. et al. Pharmacological properties of *Datura stramonium* L. as a potential medicinal tree: An overview. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 12, p. 1002-1008, 2012.

SOUTO, A. L. et al. Anti-inflammatory activity of alkaloids: An update from 2000 to 2010. **Molecules**, v. 16, n. 10, p. 8515-8534, 2011.

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, p. 1-5. 1985.

SPRAGUE, A. H.; KHALIL, R. A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochemical pharmacology**, v. 78, n. 6, p. 539-552, 2009.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

SUAREZ-JIMENEZ, G-M.; BURGOS-HERNANDEZ, A.; EZQUERRA-BRAUER, J-M. Bioactive Peptides and Depsipeptides with Anticancer Potential: Sources from Marine Animals. **Marine Drugs**, v. 10, n. 12, p.963-986, 26 abr. 2012.

SUFKA, K. J.; WATSON, G. S.; NOTHDURFT, R. E.; MOGIL, J. S. Scoring the mouse formalin test: validation study. **European Journal of Pain**, v. 2, p. 351-358, 1998.

TALAVIYA, P.A.; VYAS, B.M.; SHARMA, D.; INDORIA, S.P.; SUMAN, R.K. Anti-inflammatory activity of four fractions of ethanolic extract of *Crotalaria burhia* Buch.-Ham. root in rats. **Natl J Physiol Pharm Pharmacol**. 2014; 4(3): 213-217.

TAVASOLIAN, B.; KHARRAZY, P. Extraction and partial purification of ricin from *Ricinus communis* L. **Pahlavi medical journal**, v. 9, n. 1, p. 21-26, 1978.

TEDDER, T. F. et al. The selectins: vascular adhesion molecules. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 10, p. 866-873, 1995.

TEGEDER, M.; WEBER, A. P. M. 4 Metabolite transporters in the control of plant primary metabolism. **Control of Primary Metabolism in Plants**, v. 22, p. 85-120, 2008.

TIWARI, P.; MISHRA, B. N.; SANGWAN, N. S. Phytochemical and pharmacological properties of *Gymnema sylvestre*: an important medicinal plant. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

TJØLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TRONCOSO, M. F. et al. A novel trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds, with lectin-like properties, triggers rat lymphoma cell apoptosis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 411, n. 1, p. 93-104, 2003.

VALLI, M. et al. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 11, p. 2278-2287, 2012.

VAN AMERSFOORT, E. S.; VAN BERKEL, T. J.C; KUIPER, J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 3, p. 379-414, 2003.

VAN LOON, L. C; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 44, p. 135-162, 2006.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538-1550, 2011.

VASCONCELOS, M. C. A. et al. Avaliação de atividades biológicas das sementes de *Stryphnodendron obovatum* Benth (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 121-127, 2004.

VESTWEBER, D.; BLANKS, J. E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. **Physiological reviews**, v. 79, n. 1, p. 181-213, 1999.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica: organografia, quadros sinóticos ilustrados de fanerógamas**. 4 ed. rev. ampl. UFV, Viçosa. 124 p.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 166, n. 1, p. 96-103, 1969.

VIVIAN, R. et al. Dormência em sementes de plantas daninhas como mecanismo de sobrevivência: breve revisão. **Planta daninha**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 695-706, 2008.

VRIENS, K.; CAMMUE, B.; THEVISSSEN, K. Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12280-12303, 2014.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 349-374, 2000.

WAR, A. R. *et al.* Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306-1320, 2012.

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

WILLIAMS, M. C.; MOLYNEUX, R. J. Occurrence, concentration, and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. **Weed Science, Champaign**, v. 35, n. 4, p. 476-481, 1987.

WONG, J. H. *et al.* Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1221-1235, 2010.

YONEKAWA, K.; HARLAN, J. M. Targeting leukocyte integrins in human diseases. **Journal of leukocyte biology**, v. 77, n. 2, p. 129-140, 2005.

YOSHIKAWA, M.; TAKAHASHI, M.; YANG, S. Delta opioid peptides derived from plant proteins. **Current pharmaceutical design**, v. 9, n. 16, p. 1325-1330, 2003.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27, 2007.

ZHANG, X. W.; LIU, Q.; WANG, Y.; THORLACIUS, H. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, v. 133, p. 413-421, 2001.

Anexo 1: Aprovação do comitê de ética em experimentação animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: cesapl@ufpi.edu.br

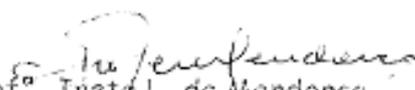


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Bioprospecção de plantas do Estado do Piauí com vistas à identificação e caracterização de proteínas com potencial biotecnológico**", protocolo nº **037/15**, sob a responsabilidade de **JEFFERSON SOARES DE OLIVEIRA**- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 27/08/2015.

Vigência do Projeto	Outubro/ 2015 à Julho/ 2017
Espécie/ linhagem	Camundongo heterogênico/Swiss
Nº de Animais	192
Peso/ Idade	20-25 g/ 45 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Centro de Ciências Agrárias- CCA da Universidade Federal do Piauí.

Teresina, 27 de Agosto de 2015.


 Prof. Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal (UFPI)
 Coordenadora