

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ATIVIDADES HEMOLÍTICA E HEMAGLUTINANTE DE EXTRATOS DE
PLANTAS DO BIOMA CERRADO**

Fabiana da Silva Paula

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas

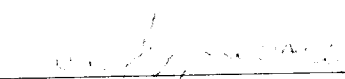
Uberlândia - MG
Dezembro – 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

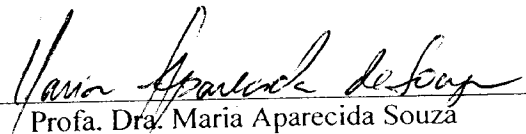
ATIVIDADES HEMOLÍTICA E HEMAGLUTINANTE DE EXTRATOS DE
PLANTAS DO BIOMA CERRADO

Fabiana da Silva Paula

Aprovado pela Banca Examinadora em 30/12/04 Nota 100



Prof. Dr. Foued Salmen Espindola



Profa. Dra. Maria Aparecida Souza

MSc. Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro

Uberlândia, 30 de dezembro de 2004.

DEDICO

Aos meus pais Ildefonso e Algenira

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ildfonso e Algenira que confiaram em minha capacidade e que agora estão começando a colher os frutos de tanto carinho, dedicação e ensinamentos.

Aos meus irmãos Frederico e Fernando que sempre estiveram por perto tentando me proteger nos inúmeros momentos que estive longe de meus pais.

Ao amado e amigo Jomar que com seus carinhos, incentivos e com a compreensão de minha ausência em muitos momentos me ajudou a seguir firme em busca de meus objetivos.

Aos colegas do Labibi Ana Clara, Andréa, Anibal, Carol, Claudia, Cibele, Ismair Juliana Hubaide, Juliana Sayuri, Karen, Karina, Leonardo, Letícia, Lorena, Lú, Renatinha, Romeu, Rosy, Vanessa, Viviane, Ismair e Gabriela com os quais dividi muitos momentos de aprendizado.

Aos colegas de trabalho Gabriela, Cyntia e Cléssio pela grande colaboração para a realização deste trabalho.

Aos doadores de sangue Rogério, Cyntia, Jomar, Leonardo, Márcio, Thiago, Luciana, Vinícius, Dona Maura, Romeu, Gabriel e eu que superamos o medo em prol da pesquisa.

Ao Professor Foued que me recebeu em seu laboratório com minhas idéias meio confusas e mesmo assim acreditou em meu potencial, ensinando-me a apaixonar pela Bioquímica. Esteja certo de que seus ensinamentos serão fundamentais para minha formação como pesquisadora.

À Professora Maria Aparecida que tanto me ensinou para que eu realizasse este trabalho.

Aos colegas da Biologia e das muitas repúblicas que morei durante o curso. Certamente aprendi um pouco com cada um deles.

À Universidade Federal de Uberlândia pelo ensino Público, quase gratuito e de qualidade.

À Universidade de Brasília por disponibilizar os extratos vegetais para a realização deste trabalho

Aos professores do curso de Biologia pelo conhecimento transmitido e aos técnicos da universidade que se empenham diariamente para manter a ordem para que possamos trabalhar.

À banca examinadora Prof. Dr. Maria Aparecida e MSc. Rosy Iara por aceitarem a participar da avaliação deste trabalho.

Obrigada,
Fabiana

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Atividade hemaglutinante nos quatro tipo sanguíneos	19
Tabela 02- Atividade hemolítica nos quatro tipos sanguíneos	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Atividade hemaglutinante em sangue tipo O	21
Figura 02 – Atividade hemaglutinante em sangue tipo A	21
Figura 03 – Atividade hemaglutinante em sangue tipo B	22
Figura 02 – Atividade hemaglutinante em sangue tipo AB	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Lectinas.....	01
1.2. Classificação das lectinas.....	03
1.3. Atividades biológicas das lectinas.....	03
1.4. Lectinas vegetais como ferramentas.....	04
1.5. Substâncias hemolíticas.....	05
2. OBJETIVOS.....	07
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	08
3.1. Preparação dos extratos.....	08
3.2. Obtenção das hemácias.....	08
3.3. Ensaio de hemaglutinação.....	09
3.4. Inibição da atividade hemaglutinante.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4.1. Atividades hemolítica e hemaglutinante.....	11
4.2. Inibição da atividade hemaglutinante.....	17
5. CONCLUSÕES.....	27
6. BIBLIOGRAFIA.....	28

RESUMO

Muitas plantas possuem em sua composição substâncias capazes de causarem lise ou aglutinação dos eritrócitos, como as saponinas e as lectinas, respectivamente. Neste estudo, analisaram-se as atividades hemaglutinante e hemolítica de cem extratos de seis espécies de plantas do bioma Cerrado em eritrócitos humanos dos quatro tipos sanguíneos do sistema ABO. O ensaio foi realizado em placas de microtitulação e os resultados expressos em Título de hemaglutinação e Título de hemólise. Os extratos analisados demonstraram possuir altos potenciais hemolíticos e hemaglutinantes, sendo que muitos deles apresentaram especificidade por determinado tipo sanguíneo. O extrato de *Matayba guianensis* teve sua atividade hemaglutinante inibida pela Lactose, indicando que este é o açúcar ligante da aglutinina, presente no mesmo. Algumas espécies analisadas são fortes candidatas a possuírem lectinas em sua composição devido à grande atividade hemaglutinante, possibilidade esta que poderá ser confirmada com estudos de purificação.

1. INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado é alvo de muitas pesquisas, não apenas por possuir um vasto território e por sua riqueza de espécies, mas também pela sua diversidade química, quando comparamos suas espécies vegetais com as espécies de algumas florestas úmidas. Esta diversidade química está relacionada com as mais variadas condições de estresse, às quais a vegetação do cerrado é constantemente submetida (KAPLAN *et al.*, 1994). Sabe-se que algumas espécies de plantas, ao serem submetidas a uma situação de estresse como, por exemplo, acrescentando-se NaCl, passam a produzir lectinas (PNEUMANS *et al.*, 2000). Lectinas são um grupo de proteínas, presentes na composição de várias plantas utilizadas na medicina popular, participando, em muitos casos, de seu princípio ativo (TIMOSHENKO *et al.*, 1994).

1.1. Lectinas

A primeira descrição de uma substância hemaglutinante foi feita em 1888 por Stillmark em sua pesquisa sobre os efeitos tóxicos da Ricina A, encontrada em sementes de *Ricinus communis* L. e de outras espécies da família Euphorbiaceae. Posteriormente, muitas substâncias similares foram descobertas em outras plantas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Atualmente, sabe-se que o efeito citotóxico da ricina e de outras lectinas se dá por uma ação catalítica no ribossomo resultando na inibição da síntese de proteínas (Proteínas Inativadoras dos Ribossomos - RIPs) (HARTLEY & LORD, 2004). Em 1907, Landsteiner e Raubitschek reportaram pela primeira vez a presença de aglutininas não-tóxicas em alguns legumes (VAN DAMME *et al.*, 1998). Muitos anos depois, essas lectinas de legumes foram objetos de interesse dos pesquisadores devido à descoberta de que elas poderiam estimular a proliferação de linfócitos (HARTLEY & LORD, 2004).

As lectinas têm ampla distribuição na natureza, sendo a única classe de proteínas presente em plantas, vírus, bactérias, fungos, parasitas, invertebrados e vertebrados (KHAN *et al.*, 2002).

O termo lectina (do latim, *legere*: que possui seletividade) passou a ser utilizado para definir essas substâncias hemaglutinantes no final da década de 40, quando Rekonen (1948) e Boyd & Reguera (1949) relataram que elas possuíam preferência por grupos particulares

de sangue humano do sistema ABO (VAN DAMME *et al.*, 1998). Hoje, sabe-se que essa especificidade está relacionada com a existência de diferentes açúcares na superfície dos eritrócitos humanos (LIS & SHARON, 1998), sendo que as lectinas tiveram um papel importante nessa descoberta (KHAN *et al.*, 2002).

As definições de lectinas já variaram muito, tornando-se progressivamente includentes (BARREIRA, 1998). Atualmente, a definição mais aceita é que as lectinas são proteínas, diferentes de anticorpos, que possuem no mínimo um domínio não-catalítico que se liga reversível e especificamente a um monossacarídeo ou oligossacarídeo (PNEUMANS & VAN DAMME, 1995). A maioria das lectinas conhecidas possui maior afinidade por oligossacarídeos do que monossacarídeos, o que pode indicar a existência de interações entre as moléculas de lectina e carboidrato fora do sítio de ligação (SHARON & LIS, 2002).

A aglutinação de células é resultante de ligações não-covalente entre os açúcares da superfície celular e os sítios específicos de ligações nas moléculas de lectinas, dos quais participam, aproximadamente, 200 aminoácidos (WEIS & DRICKAMER, 1996). As interações envolvem pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals (SHARON & LIS, 2002). As pontes de hidrogênio geralmente ocorrem entre as hidroxilas dos açúcares e as cadeias laterais carregadas dos aminoácidos ou entre os grupamentos amina e carboxila da cadeia principal da proteína (WEIS & DRICKAMER, 1996).

Estudos mostram que algumas lectinas podem possuir mais de um sítio de ligação específico para carboidratos diferentes (PEUMANS *et al.*, 2000), bem como um segundo tipo de sítio de ligação que interage com moléculas diferentes de carboidratos (BARONDES, 1988). Entre essas moléculas estão os hormônios, principalmente fito-hormônios, que se ligam a uma porção hidrofóbica da proteína, podendo esta estar envolvida na regulação do crescimento das plantas (BOGOEVA *et al.*, 2004).

As fitoaglutininas são encontradas em maiores quantidades nas sementes que nas demais partes da planta, sendo que as primeiras são mais estudadas. As lectinas de semente têm, principalmente, as funções de reserva e proteção (ESTEBAN *et al.*, 2002). Nas partes vegetativas das plantas leguminosas, elas têm a função de estabelecimento de relações

simbióticas entre estas e as bactérias fixadoras de nitrogênio, bem como de protegê-las contra diversos tipos de predadores (LIS & SHARON, 1998).

1.2. Classificação das Lectinas

Avanços na bioquímica, clonagem molecular e análise estrutural têm revelado sete famílias de lectinas vegetais relacionadas estruturalmente e evolutivamente. Em quatro delas está a maioria das lectinas conhecidas (lectinas de legumes, proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2, lectinas “*chitin-binding*” contendo domínios de “*hevein*” e lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose) (SINGH *et al.*, 2004). Existe uma similaridade dos aminoácidos presentes no sítio de ligação ao carboidrato, entre os membros da mesma família (WEIS & DRICKAMER, 1996). Porém, sabe-se que um mesmo açúcar pode interagir com diferentes lectinas de famílias distintas, por meio de aminoácidos diferentes que se organizam estruturalmente para formar o sítio de ligação do carboidrato (SHARON & LIS, 2002). Um exemplo que retrata esta propriedade, são as lectinas específicas para manose, as quais estão distribuídas nas mais diversas famílias de lectinas. A especificidade pela manose não depende diretamente da estrutura terciária e sim da estrutura quaternária da proteína (BARRE *et al.*, 2001).

As lectinas vegetais também podem ser classificadas em merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. As merolectinas são proteínas de natureza monovalente constituídas de um único domínio ligante de carboidrato e são incapazes de aglutinar células. As hololectinas possuem dois ou mais domínios idênticos ou homólogos ligantes de carboidrato, são capazes de aglutinar células e compreendem a maioria das lectinas vegetais. As quimerolectinas possuem domínios consecutivos com e sem atividade catalítica, respectivamente. As últimas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

1.3. Atividades biológicas das lectinas

Devido ao importante papel das interações proteína-carboidrato nos processos de reconhecimento biológico, essas interações tem sido alvo de permanente interesse (PLÁ *et al.*, 2003). Já foram encontradas várias aplicações práticas para as lectinas, visto que, as

mais empregadas estão relacionadas com reações de aglutinação e precipitação ou estimulação mitogênica de linfócitos (LIS & SHARON, 1998).

As aglutininas podem também induzir a produção de óxido nítrico por macrófagos, sendo esta uma forma de estimular o sistema imunológico (ANDRADE, 1999). Devido à especificidade por determinados grupos sanguíneos do sistema ABO, as lectinas podem ser também empregadas na tipagem sanguínea (BARREIRA, 1998; KHAN *et al.*, 2002).

Interações multivalentes entre lectinas e oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolipídeos, componentes da matriz e superfície celular, estão envolvidas em diversos processos de reconhecimento celular, incluindo o desenvolvimento, diferenciação, morfogênese, fertilização, resposta imune, migração celular e metástase de câncer (BENITO *et al.*, 2004).

As lectinas de origem animal possuem um mecanismo de ativação do complemento na ausência de anticorpos. Neste processo, as lectinas circulantes se ligam a resíduos de manose de polissacarídeos presentes na membrana dos microorganismos, ativando as proteínas C1r-C1s, as quais clivam C4 (ABBAS *et al.*, 2000).

1.4. Lectinas Vegetais como Ferramentas

As lectinas vegetais se tornaram importantes ferramentas no estudo da relação parasita-hospedeiro. São utilizadas para definir estágio de desenvolvimento do parasita, diferenciar espécies, bem como formas patogênicas de não-patogênicas (JACOBSON & DOYLE, 1996).

A aglutinina de *Viscum album*-I (VAA-I), em baixas concentrações, induz efeito inflamatório em neutrófilos promovendo a secreção de inúmeras citocinas, tais como TNF- α , IL-1Ra, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-10 e IL-12. Porém, em elevadas concentrações, promove a apoptose dos neutrófilos ativados por lipopolissacarídeos de bactérias (LPS). Essas propriedades antagonistas podem tornar VAA-I um modulador da atividade inflamatória dos neutrófilos (LAVASTRE *et al.*, 2004).

Existe um interesse pelas lectinas devido ao seu potencial de utilização para diagnóstico e tratamento de câncer, visto que uma pequena alteração na estrutura da lectina promove variação da sua especificidade. Elas já contribuíram para elucidação de vários aspectos de tumorigênese e metástase, tais como reconhecimento de células tumorais,

adesão celular, transdução de sinais de membrana, aumento da defesa imune do hospedeiro, citotoxicidade e apoptose (OHBA & BAKALOVA, 2003).

A aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA) e aglutinina de semente de soja (SBA) são capazes de se ligar e causar apoptose especificamente em células leucêmicas humanas, sendo inespecíficas para linfócitos normais. Foi detectado também que elas se ligam diferentemente aos distintos estágios de desenvolvimento das células tumorais. Com este conhecimento em mãos podem-se desenvolver terapias bloqueando o reconhecimento entre células específicas (OHBA & BAKALOVA, 2003).

Singh *et al.* (2004) comprovaram que uma lectina proveniente de *Arisaema flavum* (Amaryllidaceae) possui ação mitogênica sobre linfócitos T por meio da fosforilação da tirosina-quinase na membrana plasmática, bem como por estimulação da produção de IL-2. Esta lectina demonstrou ainda ação anti-proliferativa sobre colônias de células malignas inibindo a síntese de proteínas nas mesmas.

Devido às propriedades que as lectinas possuem de se ligarem a glicoproteínas e glicolípídeos de membrana, grupos de pesquisa estão investindo na possibilidade de utilizar essas proteínas como carreadores de drogas, podendo atuar como um vetor específico (BENITO *et al.*, 2004).

1.5. Substâncias Hemolíticas

Muitos extratos vegetais, quando em contato com hemácias, provocam a lise das mesmas. As saponinas são glicosídeos esteroidais ou triterpênicos distribuídos em um grande número de plantas e possuem várias propriedades biológicas, dentre as quais a mais conhecida é a atividade hemolítica. Esta propriedade é tão característica, que juntamente com a propriedade de formar espuma, é utilizada para detectar saponinas nas plantas (ROYERO, 1997).

As saponinas consistem de um ou mais resíduos de açúcar ligado a uma aglicona hidrofóbica (sapogenina), a qual pode ser triterpenica ou esteroidal. O ação hemolítica das saponinas ocorre devido a afinidade da porção aglicona da molécula por esteróides de membrana, particularmente o colesterol, que se agregam formando complexos insolúveis (FRANCIS *et al.*, 2002).

Outros efeitos biológicos das saponinas são as atividades antifúngica, antiviral, imunoestimulante (FRANCIS et al., 2002) e hipocolesterolêmica (SIDHU & OAKENFULL, 1986).

Embora as lectinas sejam as substâncias classicamente conhecidas como hemaglutinantes, existe na literatura a descrição de saponinas, tais como “*opiopogonins*” e “*ginsinocides*”, capazes de aglutinar eritrócitos humanos e de coelho. Porém, estas saponinas hemaglutinantes não são hemolíticas (FRANCIS *et al.* 2002).

O bioma Cerrado vem se mostrando como uma “farmácia viva” devido ao potencial farmacológico de suas espécies vegetais. Como descrito acima, substâncias aglutinantes e hemolíticas possuem ampla utilização direta ou indireta na cura ou entendimento de doenças. Um “*screening*” com cem extratos vegetais de espécies deste bioma pode contribuir para o mapeamento destas espécies, bem como para que possamos dispor de novas fontes de substâncias farmacologicamente ativas.

2. OBJETIVOS

- Analisar as atividades hemaglutinante e hemolítica de 100 extratos de plantas do bioma Cerrado nos quatro grupos sanguíneos do sistema ABO, fator Rh positivo;
- Verificar se os extratos testados possuem especificidade para aglutinar ou lisar as hemácias de determinado tipo sanguíneo;
- Determinar quais os carboidratos específicos para as lectinas em questão por meio de inibição da hemaglutinação com diferentes tipos de açúcares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparação dos Extratos

Para a preparação dos extratos hexânicos e etanólicos, foram coletados folha, madeira do caule, casca do caule, madeira da raiz, casca da raiz, fruto e semente de plantas no bioma Cerrado nos arredores de Brasília, Distrito Federal, Brasil. A identificação foi feita pelo Professor José Elias de Paula e suas exsiccatas depositadas no Herbário da Universidade de Brasília.

Analisaram-se as espécies *Annona crassiflora* Mart., *Xilopia aromatica*, *Xilopia emarginata* (Annonaceae); *Aspidosperma macrocarpa*, *Himatantus obovatus* (Apocynaceae); *Anemopaegma arvense*, *Cybistax antisyphilitica*, *Tabebuia caraiba* (Bignoneaceae); *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae); *Cupania vernalis*, *Matayba guianensis*, *serjania lethalis* (Sapindaceae); *Chrysophyllum soboliferum*, *Pouteria gardinerii*, *Pouteria torta*, *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae).

Os extratos foram feitos à partir de folha, casca e madeira do caule, casca e madeira da raiz e fruto, totalizando-se cem extratos. As diferentes partes das plantas foram separadas, secas à temperatura ambiente e pulverizadas em moinho de facas. Utilizaram-se o método de extração por maceração, iniciada com n-hexano, durante sete dias, repetido por quatro vezes; seguida da pré-filtração e da filtração, obtendo-se uma solução extrativa e concentrada, a qual foi dessecada em rotavapor, resultando no extrato bruto hexânico. Este processo se repetiu com etanol 95% para a extração das substâncias polares.

Os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) numa concentração de 10mg/mL e, posteriormente, armazenados à -20°C .

3.2. Obtenção das hemáceas

O sangue humano dos diferentes grupos do sistema ABO foram coletados de voluntários saudáveis por punção venosa em tubos contendo 0.1% de EDTA. Para padronizar o ensaio, utilizou-se apenas sangue fator Rh positivo. As células sanguíneas foram lavadas três vezes em solução fisiológica (0.85%) por centrifugação a 1000rpm durante seis minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, preparou-se uma suspensão de eritrócitos a 2% em solução fisiológica, a qual foi utilizada nas reações de

hemaglutinação. A utilização de sangue humano neste trabalho foi aprovada pelo comitê de ética da Universidade Federal de Uberlândia.

3.3. Ensaio de hemaglutinação

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços, fundo em V, onde primeiramente foram depositados 50µL de solução fisiológica, em cada poço. Em seguida, acrescentaram-se 50µL de extrato iniciando com uma concentração de 5 mg/mL e seguindo com uma diluição dupla serial até a concentração de 4.88×10^{-3} mg/mL. Finalmente, foi adicionado 25µL/poço de suspensão de eritrócitos.

Foram feitos dois controles para a reação, um contendo 50µL de solução fisiológica e 25µL da suspensão de eritrócitos a 2% e o outro com 50µL de DMSO em diluição dupla serial e 25µL da suspensão de eritrócitos.

As placas foram deixadas em repouso por duas horas à temperatura ambiente e, posteriormente, examinadas macroscopicamente em negatoscópio. A presença de hemaglutinação foi avaliada pelo padrão do sedimento, que apresenta a forma de um botão nas reações negativas, de um tapete circular de bordos irregulares nas reações fortemente positivas e um aspecto translúcido quando há lise da célula (PLÁ *et al.*, 2003).

A potência do extrato foi mensurada em Título de Hemaglutinação (TH), que indica o número de diluições processadas pelo extrato no último poço de diluição dupla serial, no qual houve hemaglutinação. Este parâmetro também foi utilizado para quantificar o grau de hemólise, sendo denominado Título de hemólise (Th).

Para a análise dos dados, foram considerados apenas os extratos que causaram aglutinação ou hemólise após oito diluições (concentrações inferiores a 0.625mg/mL) em pelo menos um tipo sanguíneo.

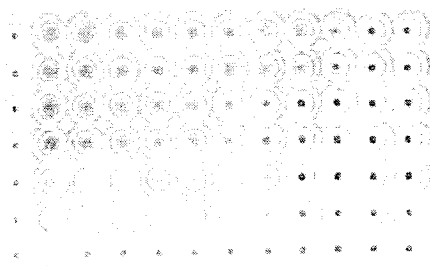


Figura 1: Placa de microtitulação

3.4. Inibição da atividade hemaglutinante

O ensaio de inibição da hemaglutinação realizou-se com os extratos que apresentaram resultados fortemente positivos na reação de hemaglutinação e não causaram lise das hemáceas. Para este experimento foi utilizado 25µL/poço dos açúcares D-galactose, D-manose, D-glicose, Dextrose, D-frutose, Maltose, Sacarose e Lactose, iniciando com a concentração de 0.2M, seguindo em diluição dupla serial até a concentração de 3.12×10^{-3} .

Em seguida, adicionaram-se 25µL/poço de extrato na antepenúltima concentração que causou hemaglutinação. Após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado aos poços 25µL de eritrócitos humanos e mantidos à temperatura ambiente. Os resultados foram analisados em negatoscópio após 2 horas em repouso.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividades Hemolítica e Hemaglutinante

As espécies analisadas apresentaram um variado desempenho em relação às capacidades hemolítica e hemaglutinante. Ao fazer o controle com o solvente DMSO, observou-se que na maior concentração testada (5mg/mL), houve lise das hemácias. Montagute *et al.* (1994) determinou por meio de ensaios *in vivo* que o solvente DMSO em altas concentrações, isto é, acima de 1 mL/ Kg possui atividade hemolítica. Portanto, os dados de hemólise só correspondem aos efeitos dos extratos em concentrações menores ou iguais a 2.5mg/mL ($Th \geq 2$).

Em seguida, encontram-se os dados de hemaglutinação e hemólise de todas as espécies analisadas, ressaltando os extratos que obtiveram os resultados mais significativos, isto é, maiores valores de Título de Hemaglutinação (TH) e Título de hemólise (Th). Os resultados obtidos estão contidos nas tabelas 1 e 2 e nas figuras de 1 a 8.

Annonaceae

Os extratos desta família tiveram pouca atividade, tanto lítica, quanto aglutinante. Os extratos hexânico da folha de *Xylopia aromatica* e etanólico da madeira da raiz de *Annona crassiflora* obtiveram Ths iguais a 64 sem especificidade para nenhum tipo sanguíneo.

Apenas o extrato etanólico da casca da raiz de *Xylopia emarginata* alcançou um maior TH, o qual foi igual a 64 e também não foi específico.

Uma lectina com afinidade para glicose e manose foi isolada da espécie *Annona muricata* (DAMICO *et al.*, 2003). *Annona coriacea* também possui lectina em sua composição a qual se liga a D-manose e D-glicose (COELHO *et al.*, 2003).

Apocynaceae

Pouca ou nenhuma aglutinação foi observada para os dez extratos analisados de *Aspidosperma macrocarpa*. Altos e específicos Ths foram obtidos apenas pelos extratos hexânicos de madeira do caule e da raiz, os quais foram iguais a 512. Este resultado foi

obtido em sangue tipo O. Os demais Ths foram iguais ou inferiores a 32. *Himatanthus obovatus* obteve baixos TH e Th, sendo o maior igual a 16.

Na família Apocynaceae existem algumas espécies que possuem lectinas em sua composição, tais como, *Rauwolfia radix* (JIN et al., 2002) e *Ecdysanthera utilis* (LIN et al., 2002). *Himatanthus obovatus* demonstrou forte efeito inibidor da proliferação de células mononucleares sanguíneas humanas estimuladas por fitohemaglutininas (SOUZA-FAGUNDES et al., 2002).

Bignoneaceae

Os extratos etanólico de casca do caule e hexânico do fruto de *A. arvense* obtiveram TH de 64 em sangue O, sendo que o último foi específico para este tipo sanguíneo.

O extrato etanólico da folha de *Cybistax antisiphilitica* lisou forte e especificamente as hemácias presentes no sangue tipo O com Th de 256. Os seus demais extratos causaram lise ou aglutinação dos eritrócitos de todos os tipos sanguíneos, no entanto em altas concentrações.

Os extratos de *Tabebuia caraiba* obtiveram poucos resultados significativos. Os extratos hexânicos de madeira do caule e casca da raiz foram os únicos que apresentaram Ths mais elevados, iguais a 128 e 64d respectivamente, em sangue tipo O.

Flacourtiaceae

Os oito extratos testados de *Casearia sylvestris* não obtiveram altos índices de hemaglutinação, porém se mostraram muito hemolíticos, principalmente em relação às hemácias do sangue tipo O, as quais foram lisadas por todos os extratos hexânicos testados (extratos de madeira, casca do caule e madeira, e casca da raiz) e pelo extrato etanólico da casca da raiz. Estes extratos se mostraram muito específicos e obtiveram Ths acima de 256d. O extrato etanólico da casca do caule não lisou os eritrócitos do sangue O e atingiu Ths entre 64 e 256 para os demais tipos sanguíneos.

Sapindaceae

Da espécie *Cupania vernalis* analisou-se dez extratos. Todos os cinco hexânicos testados tiveram pouca ou nenhuma atividade hemaglutinante. O extrato da folha obteve

Ths iguais a 1024 e 512 para os sangues tipo O e A, respectivamente, e abaixo de 32 para os demais tipos. Os extratos de madeira e casca do caule atingiram Ths em sangue O de 128 e 64, respectivamente, e inferiores a 16 nos outros tipos sanguíneos. Os Ths dos extratos de casca e madeira da raiz foram iguais ou inferiores a 8. Os extratos etanólicos demonstraram maior atividade hemaglutinante que hemolítica. O único com atividade fortemente hemolítica foi o extrato da folha, sendo específico para o tipo sanguíneo O e tendo Th igual a 1024. A forte aglutinação de todos os tipos sanguíneos foi apresentada pelo extrato de casca da raiz (THs entre 128 e 512). O extrato de madeira da raiz aglutinou sangue tipo O até a menor concentração testada e não aglutinou nenhum dos demais tipos. Por outro lado, o extrato de casca do caule, apesar de ter aglutinado os tipos sanguíneos A, B e AB, também apresentou especificidade pelo tipo O, alcançando TH 1024. Os THs dos extratos de madeira do caule e folha não ultrapassaram 64.

Analisaram-se dois extratos hexânicos e três etanólicos de *Matayba guianensis*. Fraca atividade hemaglutinante foi observada para os extratos hexânicos, sendo o maior TH igual a 64d, para o extrato de casca da raiz. O extrato da casca do caule lisou especificamente sangue tipo O (256). Em relação aos extratos etanólicos, observou-se baixa atividade hemolítica e forte ação hemaglutinante. Os extratos de casca do caule e da raiz aglutinaram fortemente os quatro tipos sanguíneos, em intensidades variáveis, não demonstrando especificidade significativa, enquanto que, o extrato de madeira do caule teve maior especificidade pelo tipo O (512).

Tanto os extratos hexânicos (quatro extratos), quanto os etanólicos (três extratos) de *Serjania lethalis* foram muito hemolíticos. No entanto, apenas os extratos hexânicos de madeira e casca do caule tiveram um maior grau de hemaglutinação, igual a 128, o qual foi específico para o sangue AB. Os extratos hexânico de casca da raiz, e etanólicos de madeira e casca do caule foram fortemente hemolíticos não apresentando especificidade significativa.

Koelreuteria Paniculata, pertencente à família Sapindaceae, possui uma lectina denominada *Kplec* específica para N-acetilglicosamina (MACEDO *et al.*, 2003). Outra espécie desta família conhecida por possuir lectina é *Talisia esculenta* (MACEDO *et al.*, 2002).

Sapotaceae

O extrato etanólico da folha de *Chrysophyllum soboliferum* lisou especificamente o sangue tipo AB com Th igual a 64.

Os extratos etanólicos da madeira da raiz de *Pouteria gardinei* obteve Th igual a 64 e o de madeira do caule alcançou TH 64. Nenhuma especificidade foi observada para estes extratos, tanto em relação aos THs quanto aos Ths.

Analísaram-se quatro extratos hexânicos e três etanólicos de *Pouteria ramiflora*. Os hexânicos apresentaram pouca atividade, tanto hemaglutinante, quanto hemolítica. O extrato da folha foi o único com alta atividade hemaglutinante, a qual foi específica para o sangue AB e com TH igual a 128. O extrato de casca do caule hemolisou especificamente no sangue tipo A com Th igual a 128. Os etanólicos obtiveram mais resultados significativos. O extrato de casca da raiz aglutinou sangue O e B com THs de 512 e 128, respectivamente, enquanto que para os sangues A e AB ele foi extremamente lítico (256 e 512, respectivamente). Os extratos de madeira da raiz e do caule foram muito líticos, não apresentando especificidade por nenhum tipo sanguíneo, porém aglutinaram apenas sangue B e AB.

Os extratos de *Pouteria torta* causaram hemólise em graus quase que insignificantes (menores ou iguais a 4). Os extratos etanólicos de folha e madeira do caule causaram aglutinação com THs entre 32 e 128, porém sem especificidade pelos tipos sanguíneos.

Os demais extratos analisados foram omitidos, pois demonstraram pouca atividade hemolítica ou hemaglutinante.

Este estudo não realizou nenhum ensaio de purificação de princípio ativo para comprovar se as substâncias hemaglutinantes presentes nos extratos são de fato lectinas. Porém, esta suposição é aceitável principalmente pela constatação de especificidade por parte de muitos extratos, a qual é característica destas proteínas. A propriedade de aglutinar especificamente é usada como ferramenta para diferenciar os grupos ou subgrupos sanguíneos (KHAN *et al.*, 2002).

Os extratos que aglutinaram especificamente o sangue tipo O foram o hexânico do fruto de *A. arvense*, os etanólicos da casca do caule e da madeira da raiz de *C. vernalis* e o etanólico da madeira do caule de *M. guianensis* (Fig. 1).

Várias lectinas específicas para sangue O são utilizadas como ferramenta para tipagem sanguínea, tendo como principal açúcar ligante a L-fucose. Algumas lectinas de fungos, tais como as de *Pleurocybella porrigens*, *Naematoloma sublateralitium* e *Pholiota squarrosa* são utilizadas para determinar sorologicamente sangue tipo O. (KHAN *et al.*, 2002). Almanza *et al* (2004) isolou uma lectina da semente de *Galactia lindenii* específica para sangue tipo O. Esta tem sua atividade inibida apenas por açúcares derivados de galactose, sendo mais específica para N-acetil galactosamina.

Os extratos que demonstraram maior seletividade pelo sangue tipo A foram o hexânico da madeira do caule de *T. caraiba* e o etanólico da folha de *C. vernalis* (Fig. 2).

Várias lectinas são específicas para o sangue tipo A, mas poucas são específicas o suficiente para serem utilizadas na determinação do tipo sanguíneo. A lectina de *Dolichos biflorus* é a mais utilizada para este fim. As lectinas de *Phaseolus limensis*, *Vicia cracca* e *Crotolaria striata* também são específicas para este tipo sanguíneo (KHAN *et al.*, 2002).

Em relação ao sangue tipo B, o único extrato que o aglutinou seletivamente foi o etanólico da folha de *C. soboliferum* (Fig. 3).

Lectinas específicas para sangue tipo B são encontradas em *Griffonia simplicifolia*, *Ptilota plumosa* e *Clavulinopsis fusiformis*. Esta última teve sua atividade hemaglutinante inibida pelos açúcares D-galactose, Rabinose e Melibiose (KHAN *et al.*, 2002).

O sangue AB foi aglutinado especificamente pelos extratos hexânicos da madeira do caule de *A. macrocarpa*, da madeira e casca do caule de *S. lethalis* e hexânico da folha e etanólico da madeira do caule de *P. ramiflora* (Fig. 4).

A lectina HHL extraída do corpo de frutificação do cogumelo *Higrophorus hipothejus* aglutina especificamente sangue tipo AB e tem sua atividade inibida pela lactose. GS-I, uma lectina específica para sangue AB presente na planta *Griffonia simplicifolia* é composta de duas subunidades, sendo uma específica para D-galactose e a outra para N-acetil galactosamina (KHAN *et al.*, 2002).

Alguns extratos demonstraram especificidade por dois tipos sanguíneos, como os extratos etanólicos da folha de *S. lethalis* que aglutinou apenas os sangues tipo O e AB, da casca da raiz de *P. ramiflora*, específico para os sangues tipo O e B e o extrato da madeira da raiz da mesma espécie, que foi altamente específico para os sangues tipo B e AB.

Os determinantes antigênicos que diferenciam os tipos sanguíneos do sistema ABO são unidades terminais de monossacarídeos presentes em glicoesfingolípídeos nas membranas dos eritrócitos. O resíduo final do sangue tipo A é o N-acetil galactosamina, do sangue tipo B, a Galactose e do tipo O, a Fucose (KHAN *et al.*, 2002).

Os eritrócitos possuem uma glicoproteína de membrana denominada glicoforina A. Uma média de 60 unidades de monossacarídeos distribuídos em dezesseis cadeias de carboidratos são ligadas covalentemente aos resíduos amino-terminais da porção extracelular da cadeia polipeptídica. Cada tetrassacarídeo possui dois resíduos de Ácido Siálico, um de Galactose e um de N-acetil galactosamina (NELSON & COX, 2000). A glicoforina A é responsável pela diferenciação dos tipos sanguíneos do sistema MN (KHAN *et al.*, 2002).

Analisando os resultados, pôde-se observar que em concentrações mais elevadas, muitos dos extratos testados são hemolíticos, sendo que dos 100 testados apenas 14 não lisaram as hemácias de nenhum tipo sanguíneo. Alguns extratos causaram lise dos eritrócitos até às menores concentrações testadas.

Observou-se também que muitos extratos apresentaram especificidade para lisar determinados tipos sanguíneos, visto que apesar de em alguns casos a diferença não ter sido significativa, em outros foi bem marcante. Esta especificidade ocorreu mais em relação ao sangue tipo O. Os extratos hexânicos de madeira do caule e da raiz de *C. sylvestris* e etanólico da folha de *C. vernalis* hemolisaram sangue tipo O mesmo depois de diluídos 1024 vezes (menor concentração testada) (Fig. 5), porém causaram lise nos outros tipos sanguíneos apenas em elevadas concentrações. Os demais extratos que demonstraram hemólise específica no sangue tipo O foram: extrato etanólico da folha de *C. antisyphilitica*, extratos hexânicos de madeira do caule e da casca da raiz de *T. caraiba*, da madeira do caule de *C. vernalis* e da casca do caule de *M. guianensis*, extratos hexânicos de casca da raiz e do caule e etanólico da casca da raiz de *C. sylvestris*.

O único extrato que hemolisou especificamente o sangue tipo A foi o extrato hexânico da casca do caule de *P. ramiflora* (Fig. 6). O extrato hexânico da folha de *C. vernalis* lisou seletivamente os sangues tipo O e A. Nenhuma especificidade exclusiva foi detectada para os sangues tipo B ou AB. Porém o extrato hexânico da casca da raiz de *P. ramiflora* lisou seletivamente tanto sangue A, quanto AB (Figs. 7 e 8).

Estes dados podem sugerir que a substância hemolítica presente nos extratos tenha algum tipo de especificidade para componentes da membrana dos eritrócitos, podendo ser também açúcares, assim como ocorre na aglutinação. As substâncias presentes nas plantas mais conhecidas por causarem hemólise são de um grupo de glicosídeos denominados saponinas, as quais são amplamente distribuídas em muitas famílias de plantas (SIDHU & OAKENFULL, 1986). No entanto, estudos recentes demonstraram que a aglutinina do gérmen de trigo e lectina de *Maclura pomifera* também têm a atividade hemolítica. A ligação dessas lectina a glicoforina A promove o aumento da permeabilidade da membrana plasmática do eritrócito aos cátions, como o Na^+ , o que leva à entrada de água na célula, ocasionando a lise da mesma (BRAIN *et al.*, 2002). Kouzuma *et al.* (2003) isolou uma lectina do invertebrado marinho *Curcumaria echinata* com atividade hemolítica, que após sua ligação aos carboidratos de membrana, formam-se poros permeáveis a íons devido às interações hidrofóbicas com a membrana celular.

Não há na literatura nenhum dado que comprove especificidade de saponinas pelos diferentes tipos sanguíneos do sistema ABO, aumentando a possibilidade de que lectinas estejam lisando as hemácias.

4.2. Inibição da atividade hemaglutinante

Este ensaio analisou a inibição da ação hemaglutinante dos extratos que tiveram as maiores atividades hemaglutinante e nenhuma hemolítica frente aos açúcares D-galactose, D-manose, D-glicose, Dextrose, D-frutose, Maltose, Sacarose e Lactose.

Os extratos analisados foram: etanólico de madeira do caule de *Pouteria torta* nos sangues A e AB, etanólico de casca da raiz de *Matayba guianensis* em sangue AB e etanólico de casca da raiz de *Cupania vernalis* nos sangues O e AB.

O extrato de *M. guianensis* foi o único que teve sua atividade hemaglutinante inibida por um açúcar. o qual foi a lactose. A lactose inibiu a hemaglutinação apenas na concentração de 0.4M, não inibindo em concentrações iguais ou inferiores a 0.2M.

Neste estudo determinou-se que o açúcar ligante da aglutinina presente no extrato etanólico da casca da raiz de *M. guianensis* é a lactose. porém, as substâncias hemaglutinantes presentes nos demais extratos podem ser específicas tanto para os açúcares

presentes na glicoforina A ou nos esfingolípídios acima descritos, quanto para outros presentes na superfície dos eritrócitos.

Turton *et al.* (2004), ao analisar estruturalmente uma lectina específica para lactose de *Erythrina cristagalli* (ECL), constatou que seu sítio de ligação é composto pelos resíduos Gly107, Asn133, Ala218, and Gln219, os quais se ligam às hidroxilas dos carbonos 2, 3 e 6 da galactose e 2 da glicose.

Tabela 1 – Atividade hemaglutinante nos quatro tipos sanguíneos.

Família/espécie	Código ¹	Parte/ Solvente	Título de Hemaglutinação ²			
			Sangue O	Sangue A	Sangue B	Sangue AB
Anonaceae						
<i>Annona crassiflora</i>	1	F/E	16	32	16	32
<i>Xylopia aromatica</i>	2	F/E	32	32	16	32
	3	MR/E	32	32	16	16
	4	CC/H	8	16	8	8
<i>Xylopia emarginata</i>	5	CR/H	8	16	2	8
	6	MR/H	8	8		16
	7	CR/E	8	16	4	64
	8	MR/E	16	16		32
Apocynaceae						
<i>Aspidosperma macrocarpa</i>	9	MC/H				32
	10	CC/E	4	4	2	8
	11	F/E				8
<i>Himatanthus obovatus</i>	12	CR/H	16			
Bignoniaceae						
<i>Anemopaegma arvense</i>	13	MC+CC/H		16		
	14	Fr/H	64			
	15	Fr/E	16		1	2
	16	MC+CC/E	64	16	2	16
<i>Cybistax antisyphilitica</i>	17	F/H	8	16		16
<i>Tabebuia caraiba</i>	18	CC/H		4		8
	19	F/E	8	4		2
	20	MC/H		32		
	21	MC/E		8		
	22	CC/E	4	8	4	16
Flacourtiaceae						
<i>Casearia sylvestris</i>	23	CR/H		8		
	24	MC/E	16		8	32
	25	MR/H			16	4
	26	CC/E	32			
Sapindaceae						
<i>Cupania vernalis</i>	27	CC/H		32	16	16
	28	MR/H		8		
	29	MC/H		32	8	2
	30	MC/E	16		32	32
	31	CR/E	512	512	128	512
	32	F/E		64	8	
	33	CC/E	1024	128	64	4
	34	R/E	1024			
<i>Matayba guianensis</i>	35	CC/H			4	32
	36	CR/H	16	32		64
	37	CC/E	512	256	128	32
	38	MC/E	512	32	2	4
	39	CR/E	256	128	512	256

<i>Serjania lethalis</i>	40	F/H	32			
	41	MC/H			16	128
	42	CC/H				128
	43	F/E	64			64
	44	MC/E	32			
Sapotaceae						
<i>Chrysophyllum soboliferum</i>	45	F/E		4		32
<i>Pouteria gardnerii</i>	46	MR/E	32			16
	47	MC/E	16	16		4
	48	F/E	64	64		32
	49	MC/E	128	64		64
<i>Pouteria ramiflora</i>	50	R/H	32	8		8
	51	F/H		16		8
	52	CR/E	512			128
	53	MR/E				128
	54	MC/E				32

1-este código é utilizado nos gráficos de hemaglutinação; 2- TH- última diluição capaz de causar hemaglutinação; E- etanol, H- hexano; F- folha; CC- casca do caule; MC- madeira do caule; CR- casca da raiz; MR- madeira da raiz; Fr- fruto

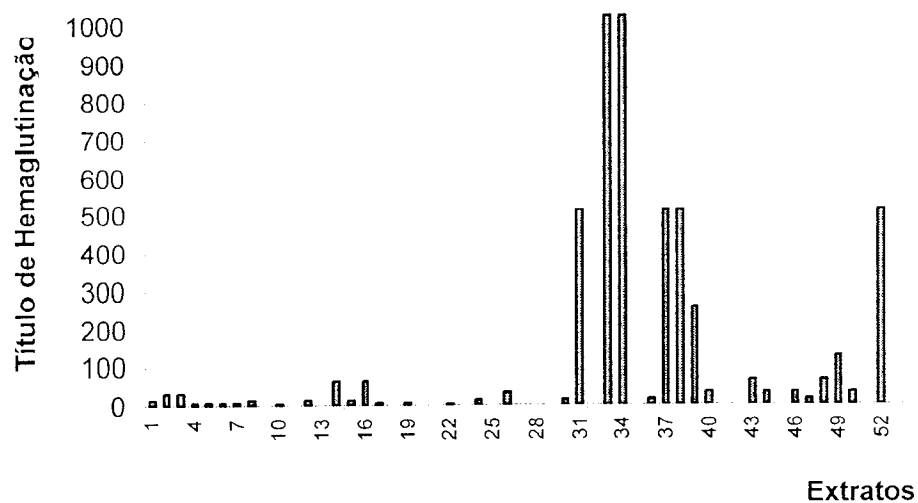


Figura 1 – Atividade hemaglutinante em sangue tipo O. Os extratos correspondentes aos códigos do gráfico estão na tabela 1.
 14- H/Fr- *A. arvense*; 33- E/CC- *C. vernalis*; 31- E/CR-*C. vernalis*; 38-E/MC- *M. guianensis*

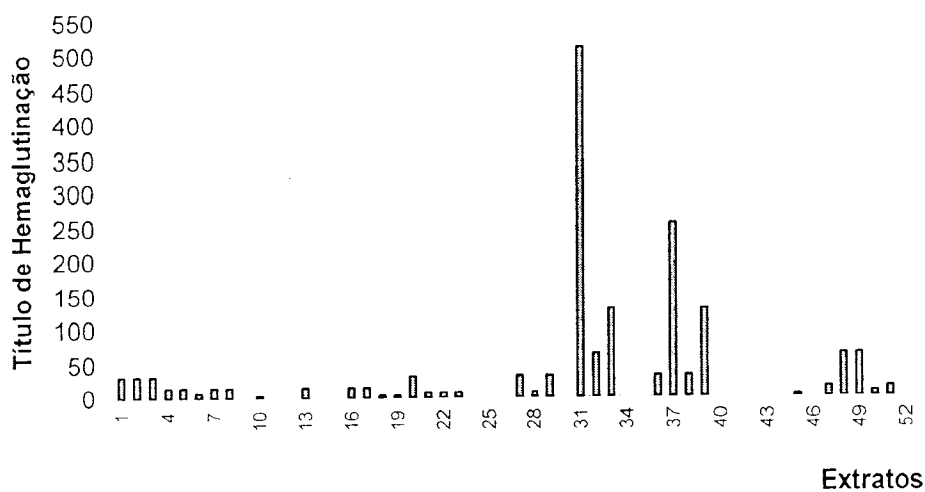


Figura 2 – Atividade hemaglutinante em sangue tipo A Os extratos correspondentes aos códigos do gráfico estão na tabela 1.
 20- H/MC- *T. caraiiba*; 32- E/F- *C. vernalis*

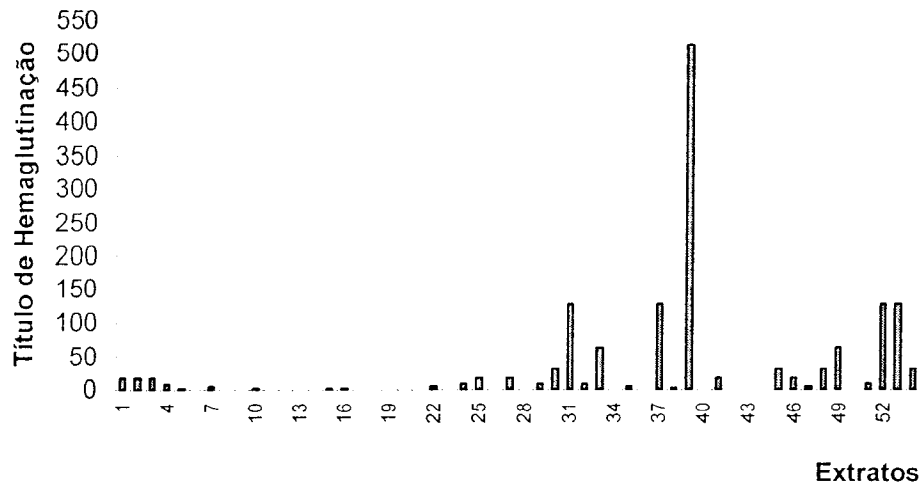


Figura 3 – Atividade hemaglutinante em sangue tipo B. Os extratos correspondentes aos códigos do gráfico estão na tabela 1.
45- E/F- *C. soboliferum*

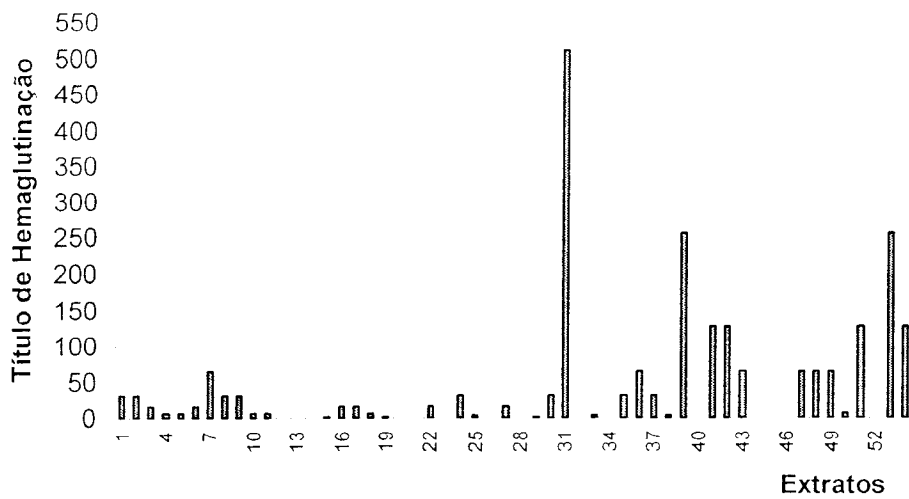


Figura 4 – Atividade hemaglutinante em sangue tipo AB. Os extratos correspondentes aos códigos do gráfico estão na tabela 1.
9- H/MC- *A. macrocarpa*; 41- H/MC- *S. lethalis*; 42- H/CC- *S. lethalis*; 51- H/F- *P. ramiflora*; 54- E/MC- *P. ramiflora*

Tabela 2- Atividade Hemolítica nos quatro tipos sanguíneos.

Familia/ Espécie	Código ¹	Parte/ Solvente	Título de hemólise ²			
			Sangue O	Sangue A	Sangue B	Sangue AB
Annonaceae						
<i>Annona crassiflora</i>	1	MR/E	32	16	16	64
	2	CR/E	16	16	16	32
	3	MC/H	4	8	8	8
	4	MC/E	16	16	16	32
<i>Xylopia aromatica</i>	5	F/H	64	32	64	32
	6	MC/E	16	32	32	16
<i>Xylopia emarginata</i>	7	MR/E	8	1	4	2
	8	CC/H	8	4	2	16
	9	F/E	16	16	4	32
Apocynaceae						
<i>Aspidosperma macrocarpa</i>	10	MC/H	512	8	4	16
	11	MR/H	512	8	16	32
	12	CR/H	16	32	32	32
<i>Himatanthus obovatus</i>	13	CR/H	8	2	1	4
Bignoniaceae						
<i>Anemopaegma arvense</i>	14	MC+CC/H	8	8	4	
	15	R/H	32	16	16	16
	16	Fr/H	16	16	8	8
	17	MC+CC/E	4	8	1	8
<i>Cybistax antisyphilitica</i>	18	MC+CC/H	4	4	16	16
	19	F/E	256	4	2	2
<i>Tabebuia caraiba</i>	20	F/H	4	2	4	8
	21	MC/H	128	16	8	32
	22	CR/H	64	4	4	8
Flacourtiaceae						
<i>Casearia sylvestris</i>	23	MC/H	1024	8	16	16
	24	CR/H	512	8	2	8
	25	CC/H	512	4	4	8
	26	MC/E	1	32		4
	27	MR/H	1024	32		2
	28	CR/E	256	8	8	16
	29	CC/E	1	64	256	128
Sapindaceae						
<i>Cupania vernalis</i>	30	CC/H	64	4	8	8
	31	CR/H	8	4	8	8
	32	MR/H	8	4	4	4
	33	MC/H	128	11	2	1
	34	F/H	1024	512	8	32
	35	MC/E	1	16	1	2
	36	F/E	1024	4	4	16
<i>Matayba guianensis</i>	37	CC/H	256	4	2	8
	38	CR/H	8	4	2	16
	39	MC/E	32	2		2

<i>Serjania lethalis</i>	40	F/H	8	2	1	1
	41	MC/H	64	8	4	4
	42	CC/H	128	64	64	16
	43	CR/H	256	128	128	32
	44	F/E	8	32	64	16
	45	MC/E	4	256	64	128
	46	CC/E	1024	512	1024	1024
Sapotaceae						
<i>Chrysophyllum soboliferum</i>	47	F/H			1	8
	48	F/E				64
<i>Pouteria gardnerii</i>	49	MR/E	4	32		64
<i>Pouteria ramiflora</i>	50	F/H		16		2
	51	CR/E	4	256	4	512
	52	MR/E	32	128	64	128
	53	MC/E	128	128		32
	54	CC/H	1	128	1	1

1-este código é utilizado nos gráficos de hemólise; 2- TH- última diluição capaz de causar hemólise; E- etanol; H- hexano, F- folha; CC- casca do caule; MC- madeira do caule; CR- casca da raiz; MR- madeira da raiz, Fr- fruto

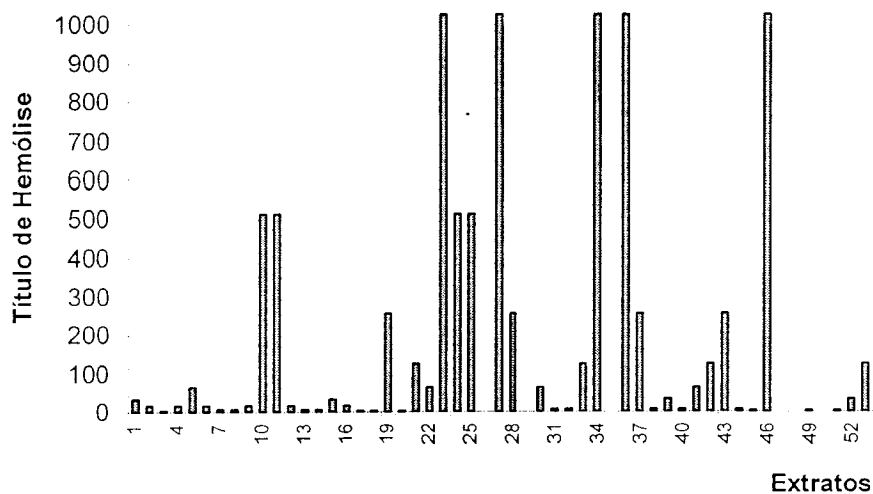


Figura 5 – Atividade hemolítica em sangue tipo O. Os extratos correspondentes aos códigos do gráfico estão na tabela 2.

19- Etanólico da folha de *C. antisiphilitica*; 21- Hexânico da madeira do caule de *T. caraíba*; 22- Hexânico da casca da raiz de *T. caraíba*; **23- Hexânico da madeira do caule de *C. sylvestris****; 24- Hexânico da casca ra raiz de *C. sylvestris*; 25- Hexânico da casca do caule de *C. sylvestris*; **27- Hexânico da madeira da raiz de *C. sylvestris****; 28- Etanólico da casca da raiz de *C. sylvestris*; 36- Etanólico da folha de *C. vernalis**; 37-Hexânico da casca do caule de *M. guianensis*

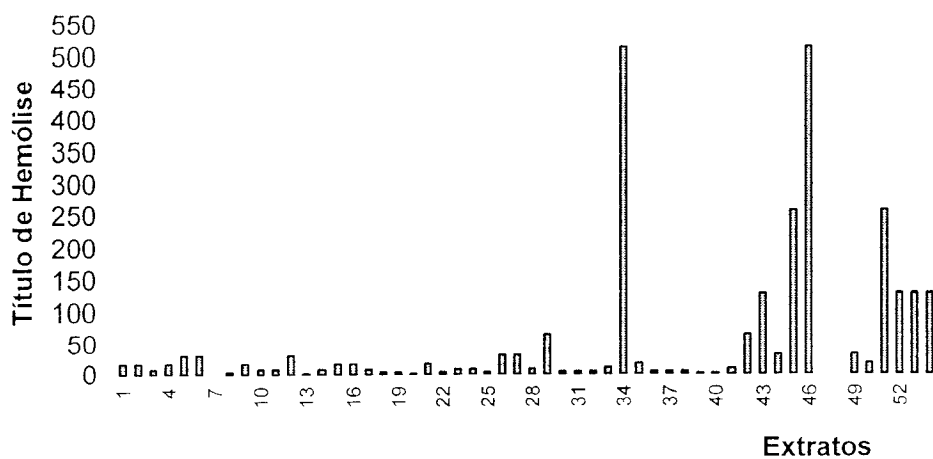


Figura 6- Atividade hemolítica em sangue tipo A. Os extratos correspondentes aos códigos do gráfico estão na tabela 2.

54- hexânico da casca do caule de *P. ramiflora*

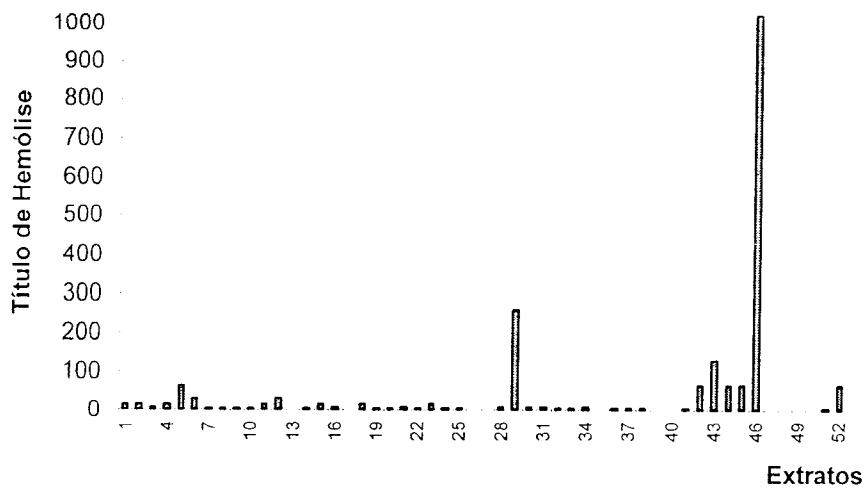


Figura 7 – Atividade hemolítica em sangue tipo B. Os extratos correspondentes aos códigos do gráfico estão na tabela 2.

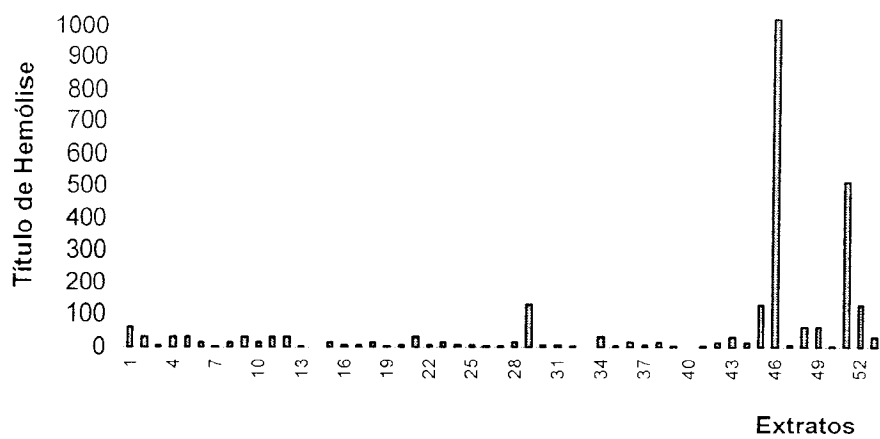


Figura 8 – Atividade hemolítica em sangue tipo AB. Os extratos correspondentes aos códigos do gráfico estão na tabela 2.

51- hexânico da casca da raiz de *P. ramiflora* – A e AB

CONCLUSÕES

- Dentre os extratos analisados, muitos possuem fortes atividades hemolítica e hemaglutinante;
- Muitos dos extratos com atividade hemolítica e hemaglutinante possuem especificidade por determinado tipo sanguíneo, a qual pode estar relacionada com os diferentes açúcares presentes nas membranas dos eritrócitos;
- O extrato etanólico da casca da raiz de *Matayba guianensis* possui um ligante do açúcar lactose em sua composição.
- Algumas espécies analisadas, tais como *Cupania vernalis*, *Matayba guianensis* e *Pouteria ramiflora* são dignas de estudos de purificação onde serão isoladas as lectinas existentes para serem analisadas suas demais propriedades biológicas.

BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. W.B.Saunders Company, fourth edition, 2000: Philadelphia.

ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CAVADA, B.S.; BARRAL-NETTO, A. Lectin-Induced Nitric Oxide Production. **Cellular Immunology**. v.194. p.98–102. 1999.

BARONDES, S.H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 13. p. 480-482. 1988.

BARRE, A.; BOURNE, Y.; VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; ROUGÉ, P. Mannose-binding plant lectins: Different structural scaffolds for a common sugar-recognition process. **Biochimie**. v. 83. p. 645-651. 2001.

BARREIRA, M.C.R.A. **Lectinas Em Imunologia: de Ferramentas a Protagonistas**. Tese (Livre docência em Imunologia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. 1998.

BENITO, J.M.; GOMEZ-GARCIA, M.; MELLET, C.O.; BAUSSANNE, I.; DEFAYE, J.; FERNANDEZ, J.M.G. Optimizing Saccharide-Directed Molecular Delivery (libertação) to Biological Receptors: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Glycodendrimer-Cyclodextrin Conjugates. **Journal of American Chemical Society**. v. 126. p. 10355-10363. 2004.

BOGEVA, V.P.; RADEVA, M.A.; ATANASOVA, L.Y.; STOITSOVA, S.R.; BOTEVA, R.N. Fluorescence analysis of hormone binding activities of wheat germ agglutinin. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1698. p. 213-218. 2004.

- BRAIN, M.C.; PREVOST, J.M.; PIHL, C.E.; BROWN, C.B. Glycophorin A-mediated haemolysis of normal human erythrocytes: evidence for antigen aggregation in the pathogenesis of immune haemolysis. **British Journal of Haematology**. v.118(3). p 899–908. 2002.
- COELHO, M.B.; FREIRE, M.G.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MACEDO, M.L.; Purification and characterization of a lectin from *Annona coriacea* seeds. **Protein and Pept Letters**. v. 10(2). p.165-73. 2003.
- DAMICO, D.C.; FREIRE, M.G.; GOMES, V.M.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MACEDO, M.L. Isolation and characterization of a lectin from *Annona muricata* seeds. **Journal of Protein Chemical**. v. 22(7-8). p. 655-61. 2003.
- ESTEBAN, R.; DOPICO, B; MUNOZ, F.J; ROMA, S.; LABRADOR, E. A seedlin specific vegetative lectin gene is related to development in *Cicer arietinum*. **Physiologia Plantarum**. v.114. p. 619–626. 2002.
- FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**. v.88. p.587-605. 2002.
- HARTLEY, M.R.; LORD, J.M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1701. p. 1-14. 2004.
- JACOBSON, R.L.; DOYLE, R.J. Lectin-Parasite interactions. **Parasitology Today**. v. 12(2). p. 55-60. 1996
- JIN, G.B.; HONG, T.; INOUE, S.; URANO, T.; CHO, S.; OTSU, K.; KITAHARA, M.; OUCHI, Y.; CYONG, J.C. Augmentation of immune cell activity against tumor cells by *Rauwolfia radix*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 81. p. 365-372. 2002.

KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; GOTTLIEB, O. R. Chemical Diversity of Plants from Brazilian Cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 66(supl.). p. 49-53. 1994.

KHAN, F.; KHAN, R.H.; SHERWANI, A.; MOHMOO, S.; AFZER, M.A. Lectins as markers for blood grouping. **Med. Sci. Monit.** v. 8(12). p. 293-300. 2002.

KOMUZA, Y.; SUZUKI, Y.; NAKANO, M.; MATSUYAMA, K.; TOJO, S.; KIMURA, M.; YAMASAKI, T.; AOYAGI, H.; HATAKEYMA, T. Characterization of functional domains of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*. **Journal of Biochemistry**. v. 134(3). p. 395-402. 2003.

LAVASTRE, V.; CAVALLI, H.; RATTHE, C. ; GIRARD, D. Anti-inflammatory effect of *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation *in vivo*. **Clinical & Experimental Immunology**. v. 137(2). p. 272. 2004.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1571 p. 83-88.2002.

MACEDO, M.L.R.; DAMICO, D.C.S.; FREIRE, M.G.M.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C. Purification and Characterization of an *N*-Acetylglucosamine-Binding Lectin from *Koeleria paniculata* Seeds and Its Effect on the Larval Development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Agricultural and Food Chemical**. v. 51. p. 2980-2986. 2003.

MONTAGUTE, P.; MELLONI, E.; CAVALLETTI, E. Acute intravenous toxicity of dimethyl sulfoxide, polyethylene glycol 400, dimethylformamide, absolute ethanol, and

benzyl alcohol in inbred mouse strains. **Arzneimittelforschung**. v. 44(4). p. 566-70. 1994.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Worth Publishers, third edition, 2000: Ney York

NOWAK, T.P.; HAYHOOD, P.L.; BARONDES, S.H. Developmentally regulated lectin in embrionic chick muscle and myogenic cell line. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 68. p. 650-7. 1976.

OHBA, H.; BAKALOVA, R. Relationships between degree of binding, cytotoxicity and cytoagglutinating activity of plant-derived agglutinins in normal lymphocytes and cultured leukemic cell lines. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 51. p.451-458. 2003.

PLÁ, A.; ALONSO, E.; BATISTA-VIEIRA, F.; FRAGUAS, L.F. Screening for carbohydrate-binding proteins in extracts of Uruguayan plants. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 36. p. 851-860. 2003.

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

PEUMANS, W.J.; HAUSE, B.; VAN DAMME, E.J.M. The galactose binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. **FEBS letters**. v. 477. p. 186-192. 2000.

ROYERO, R.H. Obtención de crudos de saponinas hipocolesteromizantes del *Chenopodium quinoa Willd*. **Revista Cubana de Medicina Militar** . v. 26(1). p. 55-62. 1997.

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

- SIDHU, G.S.; OAKENFULL, D.G. A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. **British Journal of Nutrition**. v.55. p.643-649. 1986.
- SINGH, J.; SINGH, J.; KAMBOJ, S.S. A novel mitogenic and antiproliferative lectin from a wild cobra lily, *Arisaema avum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 318. p. 1057-1065. 2004.
- SOUZA-FAGUNDES, E.; QUEIROZ, A.B.R.; FILHO, A.M.F.; GAZZINELLI, G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ALVES, T.M.A; ZANI, C.L. Screening and Fractionation of Plant Extracts with Antiproliferative Activity on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97(8). p. 1207-1212. 2002.
- TIMOSHENKO, A.V.; CHERENKEVICH, S.N.; GABIUS, H. J. Viscun album agglutinin-induced aggregation of blood cells and the lectins effects on neutrophil function. **Biomed & Pharmacother**. v. 49. p.153-158. 1994.
- TURTON, K.; NATESH, R.; THIYGARAJAN, N.; CHADDOCH, J.A.; ACHARYA, K.R. Crystal structures of *Erythrina cristagalli* lectin with bound *N*-linked oligosaccharide and lactose. **Glycobiology**. v. 14(10). p.923-929. 2004 .
- VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectins : A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 17(6). p. 575-692. 1998.
- WEIS, W.L.; DRICKAMER, K.; Structural Basis or Recognition Lectin- Carbohydrate. **Anna Rev. Biochen**. v. 66. p. 441-473. 1996.