

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



**Ação hipoglicemiante de compostos bioativos  
extraídos de plantas. Foco nas lectinas**

**Daniel Alexandre Alpendre Baltazar**

**Monografia orientada pela Professora Doutora Ana Cristina  
Ferreira da Conceição Ribeiro, Categoria Professora  
Auxiliar e coorientada pelo Professor Doutor João Pedro  
Fidalgo Rocha, Categoria Professor Auxiliar**

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



**Ação hipoglicemiante de compostos bioativos  
extraídos de plantas. Foco nas lectinas**

**Daniel Alexandre Alpendre Baltazar**

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências  
Farmacêuticas apresentado à Universidade de Lisboa  
através da Faculdade de Farmácia**

**Monografia orientada pela Professora Doutora Ana  
Cristina Ferreira da Conceição Ribeiro, Categoria  
Professor Auxiliar e coorientada pelo Professor  
Doutor João Pedro Fidalgo Rocha, Categoria  
Professor Auxiliar**

**Resumo:**

A *Diabetes mellitus* (DM) caracteriza um grupo de doenças metabólicas resultante de anomalias na secreção e/ou mecanismo de ação da insulina que levam a um estado de hiperglicemia. A Indústria Farmacêutica aliada à constante evolução dos conhecimentos científico-farmacológicos, nas últimas décadas encontrou opções farmacológicas válidas no controlo deste flagelo, com os habituais efeitos adversos associados a qualquer fármaco. Assim, o desenvolvimento de terapêuticas que produzam resultados e que causem o mínimo de efeitos adversos possível, é de crucial importância.

Os compostos ativos provenientes de plantas com atividade farmacológica desde sempre foram um campo no qual a comunidade científica se debruçou, resultando na descoberta e utilização de constituintes bioativos com aplicação terapêutica. Os compostos fenólicos, os alcalóides, as lectinas, entre muitos outros compostos, são exemplos de compostos bioativos válidos para o desenvolvimento de futuras terapêuticas no tratamento de patologias crónicas, como a DM.

As lectinas são proteínas com distribuição em todos os organismos vivos, possuindo diversas funções biológicas, entre as quais o controlo da hiperglicémia, sendo esta uma das potencialidades recentemente identificadas e cada vez mais estudada.

A presente monografia pretende dar a conhecer a grande potencialidade dos compostos bioativos de plantas, com foco principal nas lectinas, no campo do controlo da diabetes.

Palavras Chave: Diabetes mellitus, Efeito Hipoglicemiante, Plantas Medicinais, Compostos Bioativos, Lectinas;

**Abstract:**

Diabetes mellitus (DM) characterizes a group of metabolic diseases resulting from abnormalities in the secretion and/or action mechanism of insulin leading to a state of hyperglycemia. The Pharmaceutical Industry allied to the constant evolution of scientific-pharmacological knowledge, in the last decades, found valid pharmacological options with the purpose of controlling this scourge, with the usual adverse effects associated with any drug. Thus, the development of therapies that produce results and cause as few adverse effects as possible is of crucial importance.

The active compounds from plants with pharmacological activity have always been a field in which the scientific community has focused, resulting in the discovery and use of bioactive constituents with therapeutic application. Phenolic compounds, alkaloids, lectins, among many other compounds, are examples of valid bioactive compounds for the development of future therapies in the treatment of chronic diseases, such as DM.

Lectins are proteins with a large distribution in all living organisms, having several biological functions, among which the control of hyperglycemia, as one of the recently identified and increasingly studied potentialities.

This monograph aims to show the great potential of plant bioactive compounds, with a main focus on lectins in the field of diabetes control.

**Key Words:** Diabetes mellitus, Hypoglycemic Effect, Medicinal Plants, Bioactive Compounds, Lectins;

**Metodologia:**

A presente monografia foi construída tendo por base a pesquisa de informação, termos e conhecimentos dentro do tema proposto em diversas plataformas e fontes. O motor de busca Pubmed, artigos científicos em revistas da área, teses e alguns livros na área da Fitoterapia foram a base para a pesquisa e desenvolvimento do tema.

A pesquisa foi feita tendo por base a inserção de palavras chave, tendo como finalidade a reunião da máxima informação, para construir um trabalho informativo, descritivo e que aborde todos os objetivos propostos.

O foco da pesquisa centrou-se nos compostos bioativos extraídos de plantas, com ênfase para as suas principais aplicações terapêuticas, nomeadamente a sua possível ação no controlo dos níveis de glicemia.

A contextualização da pesquisa foi também feita tendo em conta o estado da arte, mas também todo o conhecimento acumulado nas últimas décadas sobre as lectinas e as suas principais aplicações.

Toda esta pesquisa tem o propósito de dar a conhecer a evolução do conhecimento, contribuindo com mais informação sobre esta área tão vasta, mas apaixonante, da Fitoterapia.

### **Lista de Abreviaturas:**

ADP-Adenosina Difosfato

ADV- Adenovírus

Ang II- Angiotensina 2

ATP-Adenosina Trifosfato

CAT- Catalase

COX- Cicloxigenase

CRD- Domínio de reconhecimento de hidratos de carbono

C3S- Ácido cianidina-3-sambubiosídeo

CQA-Ácido cafeoilquímico

DM- Diabetes mellitus

DM 1-Diabetes Mellitus tipo 1

DM 2-Diabetes Mellitus tipo 2

DMID- Diabetes Mellitus Insulino Dependente

DNA- Ácido Desoxiribonucleico

DPP IV-Dipeptidil Peptidase IV

EPCK- Fosfoenolpiruvato Carboxilase

GLUT 4- Transportador de Glucose 4

GLUT 2- Transportador de Glucose 2

G6Pase- Glucose-6-fosfatase

GSK3b-gene quinase glicogénio sintase

GPx- Glutatião Peroxidase

GIP-Polipéptido insulino-trópico glucose-dependente

GLP-1- Glugacon-like polipéptido-1

HbA1c- Hemoglobina glicada

HSV- Herpes simplex vírus

HSV 1- Herpes simplex vírus 1

HSV 2-Herpes simplex vírus 2

IRS 2- Recetor de Substrato de Insulina 2

JNK- Jun N-terminal quinase

KATP- Canais de Potássio sensíveis ao ATP

MLs- Lectinas mistletoe

mRNA- Ácido Ribonucleico mensageiro

NFkB- Fator de Transcrição Nuclear Kappa B

NK- Célula Natural killer

OMS- Organização Mundial de Saúde

PP- Péptido Pancreático

PGs- Prostaglandinas

RCA- Ricina

UV- Radiação Ultravioleta

ROS- Espécies reativas de oxigénio

RNS-Espécies reativas de azoto

SGLT2- Inibidores do cotransportador de sódio-glucose 2

SOD- Superóxido Dismutase

TZD- Tiazolidinedionas

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Distribuição taxonômica dos domínios de ligação de hidratos de carbono .....	24
---	----

## Lista de Figuras

<b>Figura 1-</b> Classes de alcalóides e suas bases químicas .....	7
<b>Figura 2-</b> Estruturas químicas dos principais ácidos hidroxibenzóicos .....	9
<b>Figura 3-</b> Estrutura química dos principais ácidos hidroxicinâmicos .....	9
<b>Figura 4-</b> Estrutura da cumarina.....	10
<b>Figura 5-</b> Estrutura base dos flavonóides.....	11
<b>Figura 6-</b> Estrutura em 3D de um monômero de lectinade leguminosa .....	19
<b>Figura 7-</b> Estrutura quaternária: tetramerização de uma lectina, concanavalina .....	20
<b>Figura 8-</b> Representação esquemática das interações proteína-hidrato de carbono no local de ligação da aglutinina de amendoim.....	21
<b>Figura 9-</b> Ligação da lactose e do dissacárido tantígeno b à aglutinina de amendoim .....	22
<b>Figura 10-</b> Esquema ilustrativo: estrutura de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.....	25
<b>Figura 11-</b> Indução de sinalização dos recetores de morte celular, via extrínseca por lectinas .....	32
<b>Figura 12-</b> Indução da morte celular cancerígena mediada por lectina através de uma rede de sinalização da morte celular programada.....	33
<b>Figura 13-</b> Mecanismo de ação da insulina no metabolismo da glucose .....	37

## Índice

Resumo.....	I
Abstract.....	II
Metodologia.....	III

VI

Lista	de	
Abreviaturas .....		IV
Lista	de	
Tabelas.....		V
Lista de		
Figuras .....		VI
Capítulo I.....		4
Introdução.....		4
1. Plantas como Reservatório de Compostos Bioativos.....		6
1.1. Alcalóides.....		6
1.1.1. Classificação.....		6
1.1.2. Bioatividade.....		7
1.1.2.1. Atividade Hipoglicemiante.....		7
1.2. Compostos Fenólicos.....		8
1.2.1. Classificação.....		8
1.2.1.1. Ácidos Fenólicos .....		8
1.2.1.2. Cumarinas.....		10
1.2.1.3. Os Flavonóides .....		10
1.2.2. Bioatividade dos Flavonóides.....		12
1.2.2.1. Atividade Antimicrobiana .....		12
1.2.2.2. Anti-inflamatória .....		13
1.2.2.3 Atividade Antioxidante.....		13
1.2.2.4. Atividade Antitumoral.....		14
1.2.2.5. Atividade Hipoglicemiante.....		14
1.3. Lectinas.....		15
1.3.1. Definição de Lectina.....		15
1.3.2. Bioatividade.....		16
Capítulo II.....		16
Lectinas.....		16

2. Noções Gerais.....	16
2.1. Distribuição e Ocorrência.....	16
2.2. Caracterização Estrutural das Lectinas de Plantas.....	17
2.2.1. Estrutura das Lectinas: O Monómero.....	18
2.2.2. A Estrutura das Lectinas: Estrutura Quaternária.....	20
2.3. Domínio de Reconhecimento ao Hidrato de Carbono.....	21
2.4. Classificação das Lectinas de Plantas.....	23
2.4.1. Quanto às Semelhanças de Sequência e Homologia Estrutural.....	23
2.4.2. Quanto à Estrutura e Centro Ativo.....	24
2.4.3. Quanto à Especificidade de Ligação ao Hidrato de Carbono.....	25
2.5. Funções Biológicas das Lectinas de Plantas.....	25
2.5.1. Atividade Externa das Lectinas de Plantas.....	26
2.5.1.1. Antibacteriana e Antifúngica.....	26
2.5.1.2. Atividade Inseticida.....	27
2.5.1.3. Atividade Antiviral.....	27
2.5.1.4. Toxicidade Aguda vs Toxicidade Crônica no Homem.....	28
2.6. Bioaplicação das Lectinas.....	29
2.6.1. No Diagnóstico.....	30
2.6.2. Na Terapêutica.....	30
2.6.2.1. Atividade Antitumoral.....	31
2.6.2.2. Atividade Hipoglicemiante.....	33
Capítulo III.....	34
3. Diabetes mellitus.....	34
3.1. Alterações Metabólicas na DM tipo 2.....	34
3.1.1. Metabolismo dos Hidratos de Carbono.....	34
3.1.2. Metabolismo da Insulina.....	35
3.2. Terapêutica Convencional vs Terapêutica Alternativa.....	37
3.2.1. Terapêutica Convencional.....	38
3.2.2. Terapêuticas Alternativas: Fitoterapia.....	401

3.2.2.1. Proteínas de Reserva de Leguminosas.....	41
3.2.2.2. Compostos Fenólicos e Alcalóides.....	42
3.2.2.3. $\gamma$ -Conglutina: Lectina do <i>Lupinus albus</i> .....	45
3.2.2.3.1. Inibição da DPP-IV (Dipeptidil Peptidase-IV).....	46
3.2.2.3.2. Sobreexpressão do GLUT-4 Membranar .....	46
3.2.2.3.3. Inibição da Gluconeogénese Hepática.....	47
3.2.2.3.4. Diminuição da Resistência à Insulina.....	47
4. Conclusão .....	49
Referências Bibliográficas.....	51

# Capítulo I

## Introdução

Desde sempre que o Homem tem usado as plantas como fonte de compostos bioativos, utilizados no tratamento das mais diversas patologias ao longo da história.

O conhecimento da existência de diabetes remonta desde a antiga Grécia e antigo Egípto. Cerca do ano 1000 AC, o persa Ibn Sínã, foi quem primeiro descreveu os sintomas da doença, utilizando misturas de sementes e outros órgãos de plantas medicinais para reduzir significativamente os níveis de glucose (Bertoglio *et al*, 2011).

A Etnobotânica foi durante muito tempo, a base da terapêutica e, atualmente, cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% são de origem sintética, tendo no entanto, por base o conhecimento de substâncias ativas isoladas de plantas medicinais. Este facto deve-se à grande variedade de espécies de plantas existentes na flora mundial (250-500 mil), muitas com importantes propriedades terapêuticas (Barata, 2008). Em 2012, a estimativa da OMS (Organização Mundial de Saúde), apontava para 80% da população mundial como utilizadora de medicamentos à base de plantas. Como tal, o interesse nos sistemas terapêuticos ancestrais, entre os quais a medicina chinesa e as terapêuticas indígenas, à base de plantas, têm tido crescente aplicação (Cunha, 2003; Bhusan *et al*, 2010).

A Fitoterapia, associada às propriedades nutracêuticas de alguns compostos ativos extraídos de plantas, têm sido alvo de investigação e de um grande investimento por parte da comunidade científica, e da indústria farmacêutica, com o intuito de se obterem fármacos cada vez mais seguros, alternativos e eficazes no tratamento de patologias com elevada incidência na saúde pública mundial, entre as quais a Diabetes mellitus (DM).

A Diabetes mellitus é uma desordem metabólica, de carácter crónico que afeta o indivíduo a nível fisiológico, psicológico e social. É uma doença caracterizada por hiperglicémia e alteração do metabolismo dos lípidos, hidratos de carbono e proteínas. Está descrita atualmente como a 3ª doença com maior mortalidade a nível mundial, antecedendo o cancro e doenças cardio e cerebrovasculares (Patel *et al*, 2012).

Segundo a OMS 2019, estão definidos os tipos principais de DM, nomeadamente, a DM Tipo 1, outrora designada *Diabetes mellitus* Insulino-Dependente (DMID), a DM Tipo 2, a *Diabetes mellitus* não insulino-dependente (DMNID), as formas híbridas de DM, DM

de outros tipos específicos, DM não classificável e por último a DM gestacional (WHO, 2012; WHO 2019, DGS, 2021).

A informação etnobotânica e fitoterapêutica de que dispomos hoje em dia, relata cerca de 800 plantas com propriedades antidiabéticas, sendo que em mais de um milhar de espécies testadas, foram observados os seus benefícios, tendo por base a etnofarmacologia. As plantas descritas com estas propriedades, podem exercer diferentes mecanismos de acção nomeadamente: estimularem a regeneração das células  $\beta$  dos ilhéus de Langherans, normalizarem os níveis de glucose no sangue e restabelecerem os níveis de glicogénio no fígado. A maioria destas plantas contém compostos fenólicos, glicosídeos, alcalóides, terpenos, flavonóides, lectinas, entre outros, que estão intimamente relacionados com diversos mecanismos que resultam numa acção antidiabética (Patel *et al*, 2012).

Segundo a OMS (2019), a população de diabéticos irá ultrapassar os 300 milhões em 2025, com maior prevalência na Índia, China e EUA. Em Portugal, esta desordem representa também uma das principais doenças de carácter crónico, com substancial peso, especialmente económico para o SNS. Grande parte dos casos descritos (90-95%) são referentes à diabetes tipo 2, sendo a forma mais comum da doença, caracterizada pela produção insuficiente de insulina a nível pancreático ou pela inadequada utilização da insulina pelas células do nosso organismo (Patel *et al*, 2012)

Atualmente e, após décadas de investigação, existem várias opções terapêuticas disponíveis para o controlo da diabetes, incluindo a própria insulina e várias classes de fármacos antidiabéticos orais como as biguanidas e sulfonilureias, apresentando, no entanto, estas agentes inúmeras reacções adversas, sendo algumas delas severas, não assegurando, portanto, o paradigma segurança-efetividade do tratamento por completo. Algumas dessas reacções adversas incluem episódios hipoglicémicos, alterações gastro-intestinais, como diarreias, náuseas e vómitos, hepatotoxicidade e alterações hematológicas, como trombocitopenia.

Assim, a pesquisa de agentes hipoglicemiantes com melhor perfil de segurança e eficácia, tornou-se numa das mais importantes áreas de investigação da comunidade científica (Patel *et al*, 2012).

Na presente monografia serão apresentados vários exemplos de compostos bioativos extraídos de plantas, descritos por exercerem redução dos níveis de glucose no sangue, e

possível ação terapêutica no tratamento da DM, com especial atenção para a classe das lectinas.

## **1. Plantas como Reservatório de Compostos Bioativos**

### **1.1. Alcalóides**

Os alcalóides são uma classe de compostos bioativos extraídos de plantas, caracterizados por possuírem na sua estrutura pelo menos um átomo de azoto como heteroátomo. São constituídos por carbono, hidrogênio e azoto, o qual, na maioria dos casos, forma parte de um anel heterocíclico, sendo a maioria deles oxigenados.

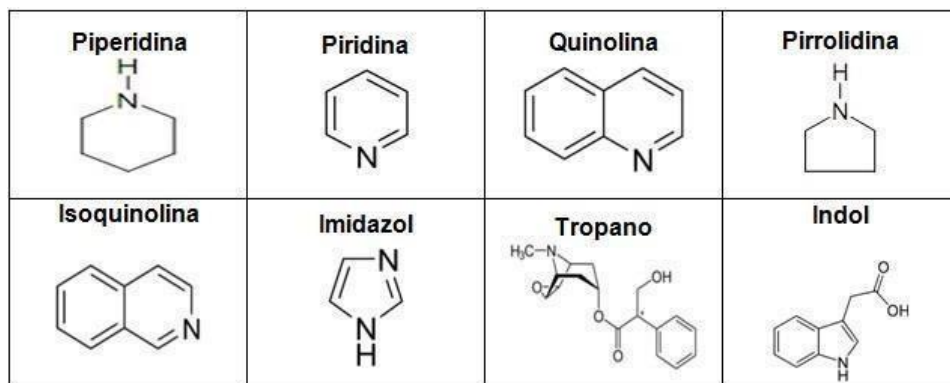
#### **1.1.1. Classificação**

Tendo em conta a origem ou via biossintética, os alcalóides podem ser classificados em: (1) alcalóides verdadeiros que se originam a partir de aminoácidos e que contêm um heteroátomo de azoto num anel heterocíclico; (2) protoalcalóides que também derivam de aminoácidos, mas não contêm azoto no sistema heterocíclico, possuindo uma cadeia lateral acíclica; (3) pseudoalcalóides que não se originam de aminoácidos. Atualmente, mais de 8.000 compostos naturais são classificados como alcalóides (Aniszewski *et al*, 2015; Kishimoto *et al*, 2016).

Os alcalóides estão largamente presentes no reino vegetal, estimando-se que 25% das gimnospermas e angiospermas produzam estes compostos bioativos. Os alcalóides estão presentes em plantas das famílias *Apocynaceae*, *Asteraceae*, *Papaveraceae*, *Rutaceae*, *Solanaceae* e *Leguminosae*, entre outras.

#### **Classificação por Classes:**

Os alcalóides dividem-se em várias classes, nomeadamente: alcalóides com grupo amina em cadeia lateral; alcalóides com núcleo pirrolidina, piridina e piperidina; alcalóides com núcleo tropano; alcalóides com núcleo pirrolizidina; alcalóides com núcleo quinolizidina; alcalóides com núcleo quinoleína; alcalóides com núcleo isoquinoleína; alcalóides com núcleo indólico; alcalóides com núcleo imidazol (Figura 1); alcalóides derivados do metabolismo terpénico; alcalóides das *Amaryllidaceae*; alcalóides betalaínicos e metilxantinas.



**Figura 1-** Classes de alcalóides e suas bases químicas (Retirado de [https://www.uc.pt/ffuc/patrimonio\\_historico\\_farmaceutico/publicacoes/catalogosdeexposicoes/catalogo\\_1exp.pdf](https://www.uc.pt/ffuc/patrimonio_historico_farmaceutico/publicacoes/catalogosdeexposicoes/catalogo_1exp.pdf))

Com a descoberta desta classe de produtos naturais, várias atividades biológicas associadas aos alcalóides foram relatadas, incluindo a analgésica, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória antitumoral, hipoglicemiante e antiviral (Kishimoto *et al.* 2016).

## 1.1.2. Bioatividade

### 1.1.2.1. Atividade Hipoglicemiante

Os alcalóides são um dos grupos de moléculas mais mencionado no que respeita à atividade hipoglicemiante, estando presentes em nove famílias de plantas utilizadas para a gestão da DM em diversas comunidades orientais. A atividade hipoglicemiante pode ser atribuída às vastas propriedades dos alcalóides como a atividade antioxidante, inibição das enzimas de digestão dos hidratos de carbono, aumento do up-take celular de glucose e aumento da capacidade de libertação de insulina. Alcalóides como a hipoglicina, a mahanimbina, vindolina I, vindolidina II, vindolicina III e vindolinina IV foram identificados como possuindo atividade hipoglicemiante (Eidi *et al.*, 2006; Tiong *et al* 2013; Oyedemi *et al* 2011).

## **1.2. Compostos Fenólicos:**

Estes compostos estão descritos como sendo metabolitos secundários, sendo um vasto grupo de fitoquímicos, com uma distribuição considerável, existindo mais de 8.000 compostos fenólicos com estruturas químicas diferentes e diversas atividades biológicas (Yáñez *et al*, 2004; Yazaki *et al*, 2009). Caracterizam-se por possuírem, pelo menos, um anel aromático ao qual se encontra ligado, um ou mais grupos hidroxilo, podendo variar de simples moléculas fenólicas a compostos com grau de polimerização considerável (Velderrain-Rodriguez *et al*, 2014).

São produzidos pela maioria das plantas, desempenhando um papel importante como parte integrante da sua estrutura, sendo essa função estrutural nos tecidos de sustentação ou proteção, bastante relevante. A participação destes compostos na estratégia de defesa contra ataques de herbívoros e agentes patogênicos, como agentes protetores contra condições climáticas desfavoráveis, como condições extremas de temperatura, stresse nutricional e hídrico, radiação ultravioleta (UV) e oxidação das biomoléculas, são outras importantes funções que os compostos fenólicos desempenham na planta como organismo vivo. Estas funções devem-se essencialmente à sua capacidade antioxidante, agindo como agentes redutores, dadores de prótons, sequestradores de radicais livres e supressores do anião superóxido (Boudet, 2007; Chunglong *et al*, 2008), durante o curso normal do metabolismo celular, prevenindo a ocorrência de danos em diversas estruturas como os lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, com conseqüentes repercussões negativas como lesões e morte celular (Zhang *et al*, 2008).

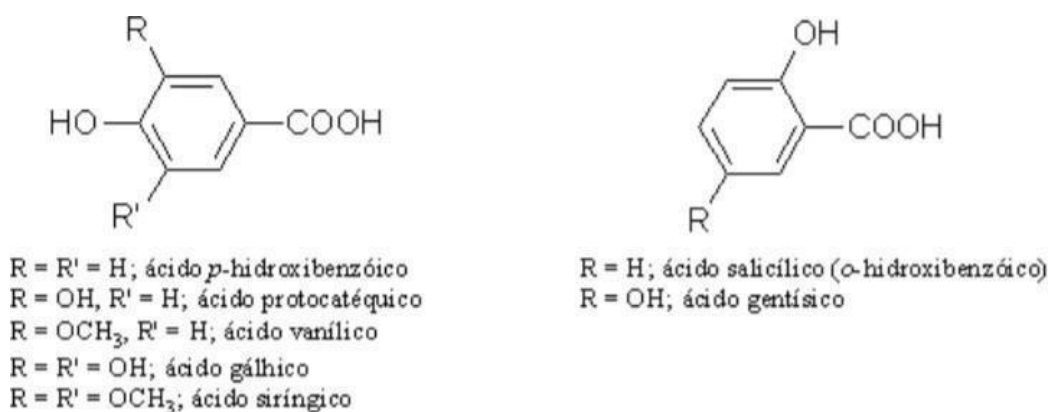
Os compostos fenólicos são sintetizados pelas plantas através das vias pentose-fosfato, chiquimato e fenilpropanóide, agrupam-se essencialmente em ácidos fenólicos, cumarinas e flavonóides.

### **1.2.1. Classificação**

#### **1.2.1.1. Ácidos Fenólicos**

Os ácidos fenólicos dividem-se em dois grupos: os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos, representando aproximadamente mais de 30% dos compostos fenólicos obtidos na dieta alimentar (Andjelkovic *et al*, 2006; Mattila *et al*, 2007).

No primeiro grupo, os ácidos hidroxibenzoicos, estes incluem o ácido gálico, o p-hidroxibenzoico, o protocatéiquico, o vanílico e o ácido siríngico, os quais apresentam a estrutura C6-C1em comum (Figura 2).



**Figura 2-** Estrutura química dos principais ácidos hidroxibenzoicos (Costa, 2009)

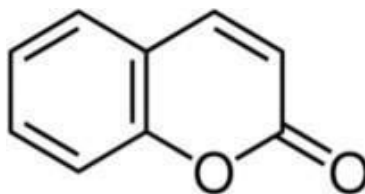
Os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos, apresentando uma cadeia lateral de três carbonos, C6-C3, sendo os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico as estruturas mais comuns (Figura 3) (Balasundram *et al*, 2006).



**Figura 3-** Estrutura química dos principais ácidos hidroxicinâmicos (Costa, 2009)

### 1.2.1.2. Cumarinas

As cumarinas, são compostos fenólicos que estão presentes naturalmente numa vasta gama de plantas, microrganismos e animais, na chamada forma glicosilada, ou até mesmo na forma livre. Esta classe exhibe uma grande quantidade de benzo- $\alpha$ -piranos com diversas atividades fisiológicas (Lake, 1999; Born *et al*, 2003). A sua distribuição nos diferentes órgãos da planta é muito heterogênea, sendo o local de maior concentração nas folhas e nos frutos, seguido dos caules e raízes, respetivamente. As propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas das cumarinas simples, dependem dos substituintes na sua estrutura química. O composto base, a cumarina (Figura 4), surge em diversas plantas, especiarias e produtos alimentares.

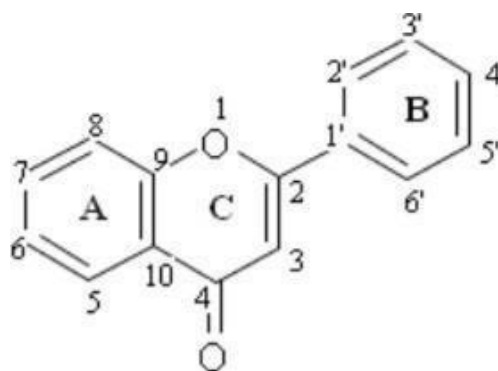


**Figura 4**-Estrutura da cumarina (Born *et al.*, 2003)

### 1.2.1.3. Os Flavonóides

São a maior classe de compostos fenólicos presentes nas plantas, existindo mais de quatro mil compostos dentro das principais classes (Wiseman, 2013). Os flavonóides encontram-se distribuídos em todas as partes da planta (Cassidy e Kay, 2013).

São moléculas de baixo peso molecular, organizando-se em 15 átomos de carbono, numa configuração de C6-C3-C6. São compostos tricíclicos possuindo dois anéis aromáticos (anéis A e B), ligados por uma cadeia alifática de 3 carbonos (Figura 5) (Peterson e Dwyer, 1998; Heim *et al*, 2002;). Na natureza podem encontrar-se cerca de 4 mil compostos, em que a sua caracterização ocorre a partir da sua estrutura química, principalmente a partir do seu grau de oxidação presente no anel C. Apesar do nome flavonóides ter origem do latim de flavus, que significa amarelo, os flavonóides geralmente são incolores e às vezes podem potenciar a coloração das plantas dentro da gama do verde até ao azul.



**Figura 5-** Estrutura base dos flavonóides (retirado de Costa, 2009)

Os flavonóides, apresentam uma biossíntese mista: o anel aromático A, deriva da via acetato, enquanto os anéis B e C são sintetizados pela via chiquimato (Costa, 2009).

Os flavonóides pertencem a uma ampla classe de substâncias químicas de origem natural, cuja síntese não ocorre em seres humanos. No entanto, apresentam uma série de propriedades farmacológicas que lhes permite atuar em sistemas biológicos sendo benéfico para a saúde humana (Peterson *et al*,1998). Até aos dias de hoje, foram descritos inúmeros flavonóides diferentes, inseridos em 6 classes principais: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanas, isoflavonóides e antocianinas.

Estes flavonóides podem ser isolados mediante diferentes técnicas cromatográficas (cromatografia em coluna aberta, cromatografia líquida de alta eficiência, e cromatografia fina de alta eficiência) e identificados por espectrofotometria de massa e ressonância magnética nuclear.

O tipo de atividade que estas classes de flavonóides desempenham refletem-se essencialmente na sua atividade antimicrobiana, imunomoduladora e anti-inflamatória, antioxidante, vascular, enzimática e antitumoral.

As propriedades antimicrobianas dos flavonóides dividem-se em: atividade antifúngica, antiparasitária, antiviral e antibacteriana.

## **1.2.2. Bioatividade dos Flavonóides**

### **1.2.2.1. Atividade Antimicrobiana**

#### **Antifúngica**

Quanto à sua atividade antifúngica, os flavonóides apresentam ampla capacidade em inibir a germinação de esporos patogênicos em plantas, tendo, portanto, a possibilidade de serem utilizados para combater infecções causadas por fungos no homem (Salas *et al*, 2011). A atividade antifúngica deve-se provavelmente à capacidade destes compostos em formar complexos com proteínas solúveis presentes nas paredes das células fúngicas (Arif *et al*, 2011).

A natureza lipofílica dos flavonóides é uma característica importante na justificação da sua atividade antifúngica, pois possibilita a ruptura das membranas fúngicas (Arif *et al*, 2011; Salas *et al*, 2011). A atividade antifúngica de uma série de flavonas preniladas, purificadas a partir de cinco diferentes plantas medicinais da família *Moraceae* foram descritas como potentes antifúngicos contra *C.albicans* e *S. cerevisiae* (Arif *et al*, 2011).

#### **Antiviral**

Quanto à atividade antiviral dos flavonóides, esta baseia-se na capacidade de ação destes compostos em se comportarem como antioxidantes, inibirem enzimas, destruírem membranas celulares, prevenirem a penetração e ligação das proteínas víricas às células e desencadearem mecanismos de auto-defesa do hospedeiro (Havsteen, 2002; Cushnie & Lamb, 2005).

A quercetina, extraída de *Caesalpinia pulcherrima*, uma erva muito utilizada na medicina tradicional Chinesa foi testada experimentalmente quanto à sua capacidade antiviral em vírus do herpes (HSV-1, HSV-2) e adenovírus. O mecanismo de ação contra estes vírus demonstrou ser por inibição precoce das fases de multiplicação dos mesmos, apresentando maior atividade para as estirpes HSV-1 e ADV-3 (Chiang *et al*, 2003).

### **1.2.2.2. Anti-inflamatória**

A atividade imunomoduladora dos flavonóides também tem merecido especial atenção por parte da comunidade científica. O efeito dos flavonóides em linfócitos B e T, macrófagos, células natural killer (NK), basófilos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos tem sido muito investigado nos últimos anos (Middleton *et al*, 2000; Cerqueira *et al*, 2003; Chirumbolo *et al*, 2010).

Segundo Havsteen (2002), têm sido realizadas diversas pesquisas que dizem respeito à atividade dos flavonóides na ativação de linfócitos T (CD8) e células NK citotóxicas. No entanto, não se conhece nenhum mecanismo de ação simples que possa explicar este fenômeno, embora se coloque a hipótese de ser devido a uma inibição da ciclooxigenase (COX), uma vez que as prostaglandinas (PGs) são capazes de eliminar os linfócitos T. O mecanismo de inibição exercido por alguns flavonóides em enzimas como a ciclooxigenase e lipoxigenase tem revelado algum interesse. A quercetina e apigenina possuem atividade anti-inflamatória pela inibição das enzimas COX-2 e óxido nítrico sintetase (Havsteen, 2002). A quercetina e a luteolina demonstraram também atividade na ativação do sistema complemento, diminuindo assim a chamada das células inflamatórias ao endotélio e por consequência, reduzindo a resposta inflamatória (Sandhar *et al*, 2011).

### **1.2.2.3 Atividade Antioxidante**

Quanto à ação antioxidante desta classe de compostos fenólicos, os flavonóides demonstraram ter ação inibidora de diversas espécies oxidantes como anião superóxido ( $O_2^-$ ), radicais hidroxil e peroxi (Sandhar *et al*, 2011). De uma forma geral, a atividade antioxidante está relacionada com a estrutura do flavonoide, dependendo assim do número de substituintes hidroxil que apresenta na sua constituição. Assim, quanto maior o número de substituintes hidroxilo, mais forte será a atividade do composto flavonoide (Havsteen, 2002). As flavonas e as catequinas demonstraram ser os flavonóides mais poderosos na proteção fisiológica, contra espécies de radicais livres que são produzidos durante o metabolismo normal do oxigênio (Tapas *et al*, 2008).

#### 1.2.2.4. Atividade Antitumoral

Os flavonóides são alguns dos grupos de produtos naturais anticancerígenos mais promissores que têm sido experimentados. Têm demonstrado ser muito eficazes contra moléculas oxidantes como por exemplo radicais livres que possivelmente estão envolvidos em danos que ocorrem ao nível do ADN e que promovem a proliferação das células malignas.

A atividade antitumoral da catequina, um flavanol presente no chá verde, *Areca catechu*, *Crutaegus oxyacantha*, *Cinnamomum cassia*, *Polygonum multiflorum*, *Rheum palmatum*, foi examinada usando modelos de invasão do tumoral. Verificou-se que este flavonoide em particular era capaz de inibir esta invasão e que a sua atividade pode estar relacionada com a sua capacidade de se ligar a um ativador tecidual do plasminogénio (t-PA) para a laminina, uma molécula de matriz extracelular, que desempenha um papel importante durante a adesão de células cancerígenas, conduzindo à inativação parcial do t-PA (Di Carlo *et al*, 1999). Os isoflavonóides, bem como outros flavonóides podem inibir o ciclo celular e induzir a apoptose em células cancerígenas que se encontram em divisão (Sandhar *et al*, 2011; Havsteen, 2002). Diferentes estudos mostraram que os flavonóides, tais como a quercetina, genísteina e luteonina, afetam a sinalização do ciclo celular. No caso da quercetina, esta bloqueia o ciclo na fase G1/S e induz a apoptose em células cancerígenas (Sandhar *et al*, 2011; Peterson *et al*, 2003).

#### 1.2.2.5. Atividade Hipoglicemiante

A atividade hipoglicemiante dos flavonóides está relacionada com uma possível indução da secreção de insulina, pela regulação da captação das moléculas de glucose pelo lúmen intestinal, em função da inibição da digestão e absorção de hidratos de carbono, através da inibição da  $\alpha$ -glicosidase e/ou da produção hepática de glucose (Valle, 2016). A relação direta entre a diabetes e a inflamação, e o potencial de flavonóides para proteção celular contra os radicais livres e outros compostos pró-oxidantes, é biologicamente plausível que o consumo de flavonóides ou de alimentos ricos em flavonóides, pode reduzir o risco de desenvolvimento do diabetes *mellitus* (Vinayagam, Chu, 2015).

A inibição da  $\alpha$ -glicosidase, tem como consequência o retardar da absorção dos hidratos de carbono ingeridos na dieta, reduzindo a glicemia pós-prandial e consequentemente os

picos de insulina, visto que a resposta glicêmica pós-prandial é um dos indicadores mais precoces de distúrbios no controle dos níveis de glicemia (Kappel *et al.*, 2013).

Outra enzima inibida pelos flavonóides é a  $\alpha$ -amilase, limitando a digestibilidade do amido e contribuindo para uma melhoria na homeostasia da glucose pós-prandial. Para além de limitar a digestão dos hidratos de carbono diretamente, os flavonóides também parecem inibir o transportador de glucose dependente de  $\text{Na}^{2+}$  (SGLT-1) no intestino (Williamson, 2013).

Como foi possível constatar anteriormente, devido à grande diversidade estrutural dos flavonóides, a sua abundância na natureza e a resposta interessante demonstrada, os flavonóides representam uma alternativa importante para a descoberta de novos agentes antidiabéticos. Por isso, vários grupos de pesquisa em todo o mundo intensificam a pesquisa de fontes alternativas para a obtenção de compostos flavonóides, assim como dos mecanismos fisiológicos e terapêuticos envolvidos (González *et al.*, 2011).

### **1.3. Lectinas**

Entre os principais compostos bioativos extraídos de plantas com possível atividade benéfica no controle da DM, as lectinas têm tido um protagonismo crescente no que diz respeito à percepção do seu papel hipoglicemiante, por um mecanismo de ação farmacológico em que ainda não existe consenso científico. Na natureza, o seu maior reservatório são as plantas e, entre elas as leguminosas.

#### **1.3.1. Definição de Lectina**

As lectinas são, por definição, proteínas com capacidade de ligação específica, estável, a hidratos de carbono, não sendo de origem imunológica, com capacidade de aglutinar células ou de precipitar complexos de hidratos de carbono, sem exercer atividade enzimática nos alvos da sua ligação, com pelo menos um domínio catalítico que se liga a um hidrato de carbono solúvel ou a um glicoconjugado, de forma reversível, não covalente e altamente específica (Van Damme *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 2011; Lam & Ng, 2011; Kumar *et al.*, 2012). Stillmark (1888), demonstrou, pela primeira vez, a atividade de Lectina em sementes de plantas de *Ricinus communis*.

### **1.3.2. Bioatividade**

Devido à sua ampla diversidade, as lectinas possuem inúmeras atividades biológicas que têm merecido especial atenção da comunidade científica, investindo-se numa ampla variedade de aplicações biológicas: entre elas a atividade antitumoral (contrariando a capacidade de mucoadesão, citoadesão e cito-invasão) (Nunes, 2015; Oliveira *et al*, 2018) e atividade hipoglicemiante; (Gabor *et al*, 2004; Grácio *et al*, 2021).

Também na área de microbiologia, existem vários estudos que demonstram a sua ação contra o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de atividade fungicida através das proteínas BLAD (Monteiro *et al*, 2015) e inseticida (Dom *et al*, 2008).

Recentemente, as Lectinas têm demonstrado importância crescente na área da Oncobiologia, onde se tem verificado e estudado que as lectinas podem detectar diferenças subtis no comportamento de alterações na glicosilação ao nível da membrana da célula tumoral que ocorrem durante o processo de carcinogénese (Damodaran *et al*, 2008; Arab *et al*, 2010; Nunes *et al*, 2015; Oliveira *et al*, 2019).

Também na área da T2DM, a lectina gama-conglutina, extraída das sementes de uma leguminosa (*Lupinus albus*), tem suscitado grande interesse, pelas suas propriedades hipoglicemiantes observados *in vitro* e *in vivo* (Grácio *et al*, 2021), que será desenvolvido no capítulo 2 (Lectinas).

## **Capítulo II**

### **Lectinas**

#### **2. Noções Gerais**

##### **2.1. Distribuição e Ocorrência**

As lectinas estão representadas nas plantas, animais e microorganismos, estando por isso presentes numa vasta maioria de organismos vivos. Por serem sintetizadas por uma variedade tão grande de organismos diferenciados, alguns dos quais com características filogenéticas tão diversas, não surpreende que as lectinas sejam diferenciadas de acordo

com a sua origem. Lectinas de cogumelo, lectinas animais e lectinas de plantas, apresentam características distintas, como as propriedades físico-químicas: peso molecular, sequenciação de aminoácidos e especificidade para hidratos de carbono. As lectinas de origem animal contribuem principalmente para as interações celulares, enquanto as lectinas vegetais são responsáveis pela defesa da planta contra predadores e patógenos com potencial de causar dano na mesma. No entanto, todas as lectinas compartilham a propriedade de envolvimento em processos biológicos normais e patológicos e todas têm vários graus de interação com o sistema imunológico (Lam & Ng, 2011; Yau *et al*, 2015).

A família das leguminosas constitui o maior grupo de lectinas caracterizadas, com maior representatividade na natureza, exibindo variedade de especificidade a hidratos de carbono (Coelho *et al*, 2017). Um número superior a 100 lectinas provenientes de leguminosas já foram caracterizadas, a grande maioria isolada das sementes (Ambrosi, Cameron, & Davis, 2005).

Nas plantas, em termos de distribuição as lectinas são encontradas em todos os órgãos, sendo que a grande maioria se encontra localizada em estruturas de armazenamento ou reserva, como sementes (Van Damme e Peumans, 1990), em estruturas denominadas de vacúolos de reserva proteica (Van Driessch 1988; Neuhaus e Rogers, 1998).

## **2.2. Caracterização Estrutural das Lectinas de Plantas**

As lectinas com origem nas plantas podem, ser classificadas em 12 famílias de acordo com os domínios de reconhecimento de hidratos de carbono (CRDs) e respectiva sequência polipeptídica. Cada família é composta por lectinas de estrutura CRD evolutiva relacionada (em termos de similaridade de sequência peptídica), que são características dessa família. Os diferentes CRDs são caracterizados pela própria sequência de aminoácidos, *foldings* polipeptídico e a estrutura do local de ligação. É importante referir que embora os CRDs difiram nas suas sequências, podem mostrar reatividade para hidratos de carbono semelhantes, indicando que a especificidade não está ligada a um determinado CRD (Walker, 2014).

As lectinas apresentam propriedades moleculares comuns (Lis e Sharon, 1986), sendo normalmente constituídas por 2 (ou por vezes 4) subunidades com massas moleculares de

25-30 kDa. Muitos exemplos de lectinas são glicoproteínas e metaloproteínas, requerendo a presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ .

O centro de ligação ao hidrato de carbono é de um por subunidade, sendo que cada subunidade apresenta especificidade idêntica de açúcar. Os hidratos de carbono poderão também ser parte integrante da estrutura das lectinas, incluindo a N-acetilglucosamina, a xilose, L-fucose, ligadas ao terminal amina. Apesar da sua presença, estes açúcares podem, por vezes, não ter qualquer peso nem preponderância nem na atividade biológica, nem no estabelecimento da ligação específica da lectina ao hidrato de carbono, havendo no entanto, algumas componetes glicano com alguma influência na atividade anteriormente descrita. (Sharon e Lis, 1990). A presença de elevado teor de aminoácidos acídicos e hidroxiaminoácidos, e baixo teor de aminoácidos sulfurados é também uma característica físico-química e estrutural das lectinas (Ambrosi, *et al* 2005). A homologia considerável de sequências encontrada entre lectinas, justifica a sua similar organização estrutural (Sharon e Lis, 1990).

Apesar da unidade monomérica bem preservada ser um aspeto compartilhado pelas lectinas, é na estrutura quaternária, a forma como as unidades monoméricas se oligomerizam, que residem as diferenças que determinam as diferentes tendências de ligação a hidratos de carbono e atividades que separam cada uma das famílias de lectinas (Loris *et al*, 1998).

### **2.2.1. Estrutura das Lectinas: O Monómero**

O monómero da lectina de uma leguminosa apresenta uma estrutura muito bem conservada. Diversos estudos têm revelado altos níveis de similiaridade tanto na sequência como na estrutura, existindo apenas pequenas variações no comprimento da cadeia e do loop (Lagarda-Diaz *et al*, 2017). Aproximadamente 20% dos resíduos de aminoácidos são conservados, sendo que os outros 80% são semelhantes aos dos aminoácidos conservados, incluindo vários envolvidos na interação com o glicano e ainda quase todos os resíduos de aminoácidos que coordenam os iões metálicos (Ambrosi *et al*, 2005).

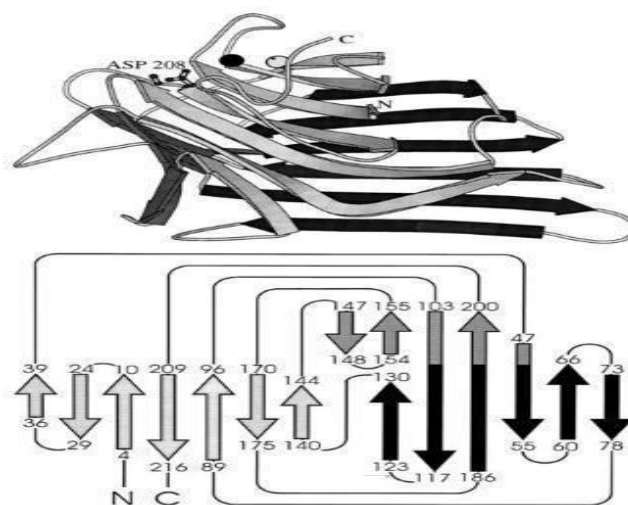
A estrutura monomérica da lectina consiste em duas grandes folhas  $\beta$ -pregueadas que formam uma estrutura na qual a região de ligação do carbono é inserida (Figura 6) (Loris

*et al*, 1998). A arquitetura do monómero exibe um *jellyroll motif*, também conhecido como a "dobra de lectina", que contém um CRD e sítios de ligação do metal a cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  fortemente ligado e um metal de transição, geralmente  $\text{Mn}^{2+}$ ) (Ambrosi *et al*, 2005). A estrutura tridimensional caracteriza-se pela presença de três folhas  $\beta$  que são conectadas por voltas  $\alpha$ , voltas  $\beta$  e dobras: uma folha posterior, constituída por 6 fitas), uma anterior (constituída por 7 fitas) e uma folha mais pequena, denominada folha- S (constituída por 5 fitas), (Figura 5), formando entre si um encaixe que forma o centro de ligação lectina-hidrato de carbono, inserindo-se neste centro a zona de ligação do hidrato de carbono (Loris *et al*, 1998; Lagarda-Diaz *et al*, 2017).

O núcleo hidrofóbico principal, está localizada entre as folhas posterior e frontal. As  $\alpha$ -hélice não estão presentes e cerca de 50% dos resíduos estão em regiões de loop com um desses loops curvando-se sobre a folha frontal, resultando na formação de um segundo núcleo hidrofóbico (Loris *et al*, 1998).

Esta disposição estrutural e topológica é também característica para grande variedade de hidratos de carbono que reconhecem, ou são reconhecidos, por determinadas proteínas, tais como as galectinas (Lobsanov *et al*, 1993).

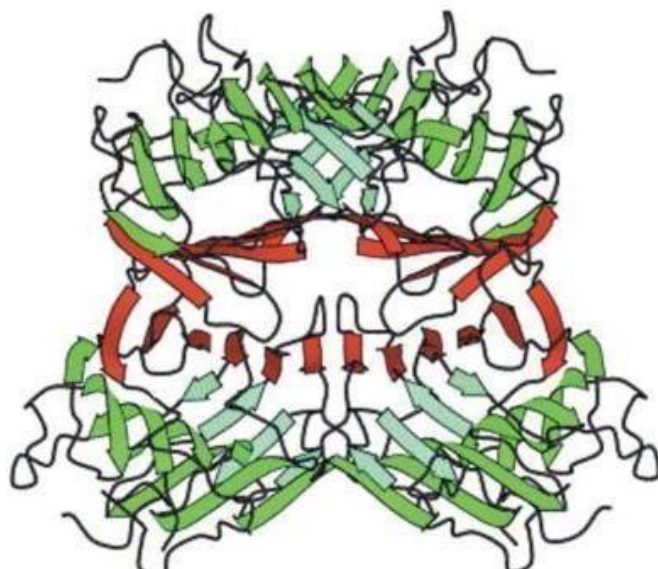
A actividade biológica das lectinas, que se dá a conhecer pela sua ligação aos hidratos de carbono, está dependente de cátions, como o  $\text{Ca}^{2+}$  e iões metálicos de transição como vimos, apresentando estes um elevado nível de conservação na estrutura da lectina. A concanavalina A é um desses exemplos, que ilustra na perfeição a ligação do cátion  $\text{Ca}^{2+}$  e iões metálicos de transição, mediante resíduos de aspartato.



**Figura 6**-Estrutura em 3D de um monómero de lectina de leguminosa (Loris *et al*, 1998)

### 2.2.2. A Estrutura das Lectinas: Estrutura Quaternária

A estrutura quaternária é a principal responsável pela variação estrutural individual considerável demonstrada pelas lectinas das leguminosas. Tudo isto se deve a pequenas diferenças nas sequências aminoacídicas nas interfaces monómero-monómero e ao processamento pós-tradução com algumas alterações (clivagem proteolítica da cadeia precursora e corte do terminal C, entre outros exemplos) (Loris *et al*, 1998; Ambrosi *et al*, 2005). A maioria das lectinas de leguminosas conhecidas até à data, apresentam tendência em agrupar-se dando origem a estruturas de homodímeros ou homotetrâmeros com a maioria das lectinas de leguminosas conhecidas a apresentar uma estrutura denominada "dímero canónico de lectina de leguminosa" que é caracterizada pelo alinhamento antiparalelo lado-a-lado das folhas  $\beta$  de seis fitas planas dos dois monômeros, resultando na formação de uma folha contínua de 12 fitas que se estende através da interface do dímero (Figura 7) (Ambrosi *et al*, 2005; Lagarda-Diaz *et al*, 2017). Algumas exceções são as lectinas da árvore de coral (*Erythrina corallodendron*) e a lectina IV de *Griffonia simplicifolia*, que têm estruturas mais "abertas" (Loris *et al*, 1998). O pH é um fator determinante na estrutura quaternária das lectinas podendo causar a dissociação de tetrâmeros em dímeros dependendo das condições (Ambrosi *et al*, 2005).



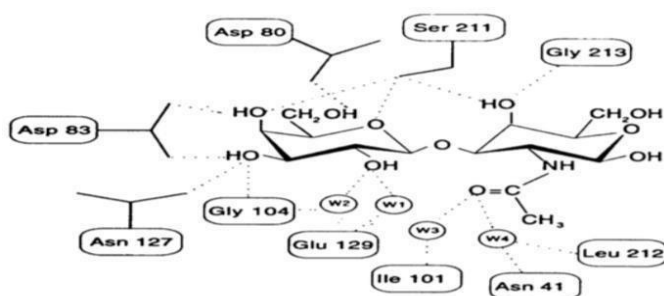
**Figura 7-** Estrutura quaternária: tetramerização de uma lectina, concanavalina A (Ambrosi, 2005)

### 2.3. Domínio de Reconhecimento ao Hidrato de Carbono

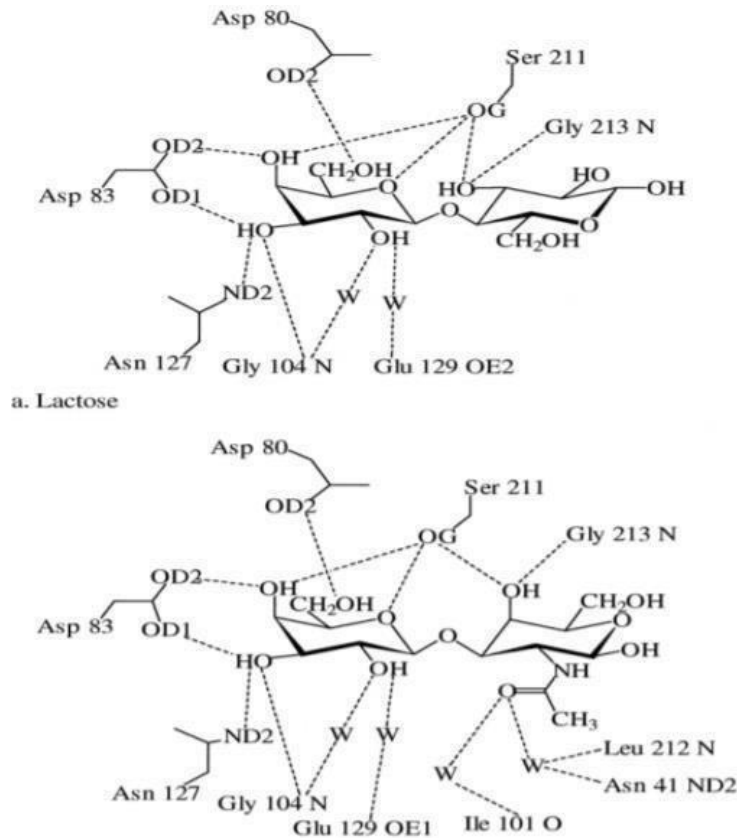
O avanço da biotecnologia nos últimos anos tem sido crucial no que respeita à compreensão molecular e estrutural do sítio de ligação da lectina ao hidrato de carbono. Sabe-se que, embora as lectinas se liguem a mono e oligossacaridos, estas apresentam maior especificidade para açúcares complexos e glicoproteínas com constantes de associação relativamente mais altas para di-, tri e tetra-sacáridos do que para monossacáridos (Ambrosi *et al*, 2005; Lagarda-Diaz *et al*, 2017).

Os locais de ligação de lectinas a hidratos de carbono parecem estar pré-formados, justificando-se com as poucas mudanças conformacionais que ocorrem durante a ligação (Ambrosi *et al*, 2005). A ligação do hidrato de carbono envolve quatro resíduos de aminoácidos que não variam, independentemente da sua especificidade, em todas as lectinas. Esses aminoácidos consistem no ácido aspártico, um asparinato, uma glicina e um aminoácido aromático ou leucina (Ambrosi *et al*, 2005; Lagarda-Diaz *et al* 2017). Apesar dos aminoácidos bem preservados e “invariáveis”, a especificidade do hidrato de carbono ainda existe, o que nos leva a concluir que resíduos de aminoácidos de outras regiões da bolsa de ligação, são também responsáveis pela especificidade.

O sítio de combinação ao açúcar é composto por resíduos de aminoácidos que se encontram em quatro loops diferentes (A, B, C e D): o ácido aspártico e a glicina pertencem aos loops A e B, respectivamente, sendo que a asparagina e o resíduo hidrofóbico estão no loop C com interações adicionais a serem atribuídas a aminoácidos no loop D que parece ser responsável pela especificidade aos hidratos de carbono (Ambrosi *et al*, 2005). O loop D é altamente variável em termos de comprimento, sequência e conformação com o seu comprimento, por exemplo, ao ser semelhante em todas as lectinas específicas de manose (Ambrosi *et al*, 2005) (Figura 8 e Figura 9).



**Figura 8-** Representação esquemática das interações proteína-hidrato de carbono no local de ligação da aglutinina de amendoim (Ambrosi *et al*, 2005)



**Figura 9** - Ilustração da ligação da lactose e do dissacárido tantígeno b à aglutinina de amendoim (Loris *et al*, 1998)

Partindo da atividade de resíduos de aminoácidos e da estrutura tridimensional do local de ligação, existem dois outros componentes principais na atividade de ligação de hidratos de carbono ao local de ligação da lectina leguminosa: moléculas de água no CRD e os locais de ligação do metal no caso de cátions divalentes, como os anteriormente descritos.

Os cátions metálicos divalentes, geralmente cátions de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , são essenciais para a atividade de ligação das lectinas aos hidratos de carbono, com a ligação ao metal localizada em estreita proximidade com o CRD, assumindo particular importância na atividade de ligação, não estando muitas vezes diretamente envolvida na própria ligação (Lagarda-Diaz *et al*, 2017).

Vários estudos mostraram, em diferentes lectinas (por exemplo, concanavalina A), uma perda da referida atividade quando ensaios de desmetalização eram realizados. Como tal, não é surpreendente que os locais de ligação do metal (ou seja, os resíduos de aminoácidos

que interagem com os íons metálicos), observados pela primeira vez na concanavalina A, sejam encontrados para ser extremamente bem conservados em todas as outras estruturas de lectina de leguminosa (Loris *et al*, 1998). A interação entre o ligante e a proteína são frequentemente mediados por moléculas de água com pequena dimensão, sendo a sua capacidade de se comportar como dador e aceitador de hidrogénio uma característica que a torna quase ideal para esta função (Ambrosi *et al*, 2005). Em muitas ocasiões, as moléculas de água na região de ligação de hidratos de carbono mimetizam o ligante numa extensão substancial, importante, não apenas no local primário, mas também nas regiões adjacentes ao mesmo (Ambrosi *et al*, 2005). A posição das moléculas de água no sítio de ligação são bem conservadas dentro de uma única espécie, mas parecem ser mal conservadas em lectinas de diferentes espécies (Loris *et al*, 1998). O aumento de ligações hidrogénio mediadas por água parece aumentar a afinidade para complexos de hidratos de carbono em oposição a açúcares simples (Van Damme *et al*, 2008). Um exemplo notável de atividade de água na ligação de açúcares é o complexo entre a aglutinina de amendoim com um dissacárido de antígeno T, onde se regista um aumento substancial (cerca de 20x) na afinidade quando comparado ao complexo entre a aglutinina do amendoim e lactose (Figura 9), inteiramente devido à mediação de moléculas de água interações proteína-hidrato de carbono mostrando que a especificidade mediada pela água pode estar presente no reconhecimento de hidratos de carbono (Loris *et al*, 1998).

## **2.4. Classificação das Lectinas de Plantas**

Existem três classificações distintas, para as lectinas de plantas.

### **2.4.1. Quanto às Semelhanças de Sequência e Homologia Estrutural**

Um dos métodos é baseado em semelhanças de sequência e homologia estrutural de acordo com as quais as lectinas de plantas podem ser agrupadas em cerca de 12 famílias diferentes: Homólogos de Agaricus bisporus agglutinina, Amarantinas, homólogos de quitinase Classe V com atividade de lectina, família das cianovirinas, família EEA , Família GNA, proteínas com domínios de heveína, Jacalina, proteínas com domínios de lectina de leguminosas, domínio LysM, família Nictaba e, família Ricina-B que estão representadas na Tabela 1 (Van Damme *et al*, 2008).

**Table 1****Taxonomical Distribution of Carbohydrate Domains found in Embryophyta**

Carbohydrate binding domain	Bacteria	Fungi	Animals	Chlorophyta	Embryophyta					
					Liverworts	Lycophytes	Mosses	Ferns	Gymnosperms	Angiosperms
ABA	- <sup>b</sup>	+	-	-	+	-	(+)	-	-	-
Amaranthin	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
CRA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Cyanovirin	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
EUL	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GNA	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Hevein	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Jacalins	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Legume lectin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LysM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nictaba	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Ricin-B	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+

(Van Damme *et al.*, 2008)

**Tabela 1-** Distribuição taxonômica dos domínios de ligação de hidratos de carbono (Van Damme *et al.*, 2008)

#### 2.4.2. Quanto à Estrutura e Centro Ativo

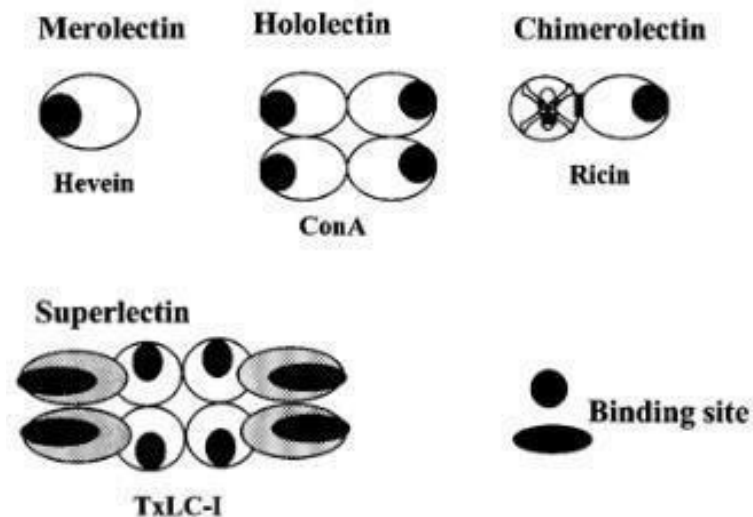
Outra forma de classificação é de acordo com a estrutura e centro ativo. As lectinas podem, portanto, ser divididas em ‘merolectinas’, ‘hololectinas’, ‘quimerolectinas’ e ‘superlectinas’ (Van Damme *et al.*, 1998) (Figura 10).

As Merolectinas consistem em estruturas de lectinas com um único domínio de ligação a hidratos de carbono.

As Hololectinas consistem exclusivamente em domínios de ligação a hidratos de carbono, mas contêm pelo menos dois desses domínios que são idênticos ou muito homólogos e ligam-se a açúcares iguais ou estruturalmente semelhantes (este grupo representa grande parte das lectinas vegetais).

As Quimerolectinas são proteínas de fusão que consistem num ou mais domínios de ligação a hidratos de carbono, dispostos em conjunto com um domínio não relacionado.

As Superlectinas consistem exclusivamente em pelo menos dois domínios de ligação ao hidratos de carbono, no entanto, ao contrário das hololectinas, os domínios de ligação ao hidratos de carbono das superlectinas reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados (Van Damme *et al.*, 1998).



**Figura 10**-Esquema ilustrativo das merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Van Damme et al, 1998)

### 2.4.3. Quanto à Especificidade de Ligação ao Hidrato de Carbono

Outra forma comumente usada de distinguir as lectinas, com enorme importância prática, é classificá-las de acordo com sua especificidade de ligação a hidrato de carbono. Estão descritas seis famílias, dependendo dos glicanos com que interagem preferencialmente podendo ser a glucose, galactose, manose, fucose, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina ou ácidos siálicos, havendo ainda algumas lectinas que se ligam preferencialmente a oligossacáridos (Kumar et al., 2012; Walker, 2014; Coelho et al., 2017). As seis famílias são divididas (de acordo com sua especificidade de ligação) da seguinte forma: (1) glucose / manose; (2) galactose / N-acetilgalactosamina; (3) N-acetilglucosamina; (4) L-fucose; (5) ácido siálico; (6) Oligossacarídeos e polissacarídeos complexos (Ribeiro, 2008).

### 2.5. Funções Biológicas das Lectinas de Plantas

As lectinas sendo um grupo de proteínas tão diverso e difundido na natureza, estão envolvidas em diversos processos vitais que garantem a sobrevivência do organismo do

qual fazem parte. Esta diversidade de funções variam desde a proteção do organismo contra ameaças externas, até a manutenção da homeostase, através do mecanismo de mediação de interações entre células. A comunicação baseada nas interações hidrato de carbono-lectina está na origem de diversos processos biológicos como a transformação, crescimento celular, metastização, inflamação e interações hospedeiro-patógeno (Majee & Biswas, 2013). Estas proteínas ligam-se a ligandos de diferentes fontes, como as animais, fúngicas, bacterianas e simbioses, e por outro lado, poderão interagir com ligandos da própria planta.

## **2.5.1. Atividade Externa das Lectinas de Plantas**

### **2.5.1.1. Antibacteriana e Antifúngica**

Vários estudos têm demonstrado o importante papel desempenhado pelas lectinas de plantas na proteção do hospedeiro do qual fazem parte e, eliminação de microrganismos que ameaçam a homeostasia do respetivo hospedeiro. As lectinas quanto ao potencial antifúngico, principalmente contra espécies fitopatogénicas, exibem atividade antifúngica estabelecendo ligação às hifas, causando inibição do crescimento e na germinação de esporos (Coelho *et al.*, 2017).

As lectinas ligam-se aos constituintes da parede celular dos fungo, interferindo com o crescimento deste. As paredes das células fúngicas contêm quitina, um polímero de GlcNAc, com ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), onde se irão ligar lectinas com especificidade GlcNAc.

É importante clarificar, relativamente às propriedades antifúngicas das lectinas, que tanto os fungos patogénicos humanos, como animais, podem ser afectados, sendo exemplo disso as lectinas extraídas da semente de *Helianthus annuus*, que demonstraram capacidade de inibir o crescimento e alterar a permeabilidade da membrana de *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, e *Pichia membranifaciens*, ao mesmo tempo que induzem a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) em *Candida Tropicalis* (Regente *et al.*, 2014).

As lectinas exógenas, no que respeita ao papel na protecção contra microrganismos, desempenham um papel na virulência bacteriana (como na actividade fúngica), através da sua ligação a hidratos de carbono específicos presentes ao nível das paredes bacterianas

e fúngicas, impedindo o reconhecimento e a aderência a locais específicos do hospedeiro, não deixando instalar a infecção.

### **2.5.1.2. Atividade Inseticida**

As lectinas de plantas apresentam um grau de toxicidade de nível moderado a elevado, no que toca à sua interação com insetos e animais (Van Damme *et al*, 2008). O papel de proteção contra ameaças externas, desempenhado pelas lectinas contra insetos e parasitas é efetuado por mecanismos diferentes dos exercidos para bactérias e fungos. Tendo em conta que as propriedades antifúngicas e antibacterianas das lectinas consistem principalmente na inibição dos microrganismos referidos por meios indiretos, como diminuir a adesão e reconhecimento desses microrganismos e prejudicar sua capacidade de reprodução e propagação, o efeito inseticida e antiparasitário das lectinas é mais direto, consistindo basicamente em aumentar a mortalidade e retardar o desenvolvimento de parasitas e insetos. Existem muitos exemplos relatados, como a lectina de *Arisaema jacquemontii*, observando-se que afetou negativamente o desenvolvimento de larvas de *Bactrocera cucurbitae* (Lam & Ng, 2011); lectinas isoladas de *Coprinopsis cinerea*, *Aleuria aurantia* e *Laccaria bicolors* mostraram efeito larvicida em *Haemonchus contortus* (verme de Barbieri), resultando na paragem do ciclo de replicação celular na fase L1; as lectinas isoladas de sementes de *Moringa oleifera* demonstraram efeitos larvicidas, ovicidas e estimulantes da oviposição em *A. aegypti*, sendo consideradas candidatas importantes para uso no controle da população de mosquitos, inclusive em armadilhas para captura de ovos (Coelho *et al*, 2017).

A atividade inseticida das lectinas de plantas é uma das qualidades mais notáveis, havendo estudos que mostram que o estímulo de insetos induz a produção de lectinas específicas em plantas como meio de defesa da própria planta, tendo sido essas lectinas chamadas de lectinas induzidas por insetos (Van Damme *et al*, 2008).

### **2.5.1.3. Atividade Antiviral**

A estrutura dos vírus é conhecida pela presença abundante de glicoproteínas no invólucro viral, sendo portanto estas estruturas alvos de uma possível interação com lectinas, abrindo uma série de oportunidades de investigação, em formulações terapêuticas para

muitas doenças de origem viral. Até aos dias de hoje, diversas lectinas foram associadas ao efeito anti-viral, por diferentes mecanismos, exemplificando com a ação anti-HIV, por diferentes lectinas: Concanavalina A, lectina “Snowdrop” (Lectina Floco de Neve), entre outras, que exibem atividade anti-retroviral, inibindo a entrada do vírus nas células do nosso sistema Imunitário CD<sup>4+</sup>;

Uma outra lectina, a do feijão Roxo extra-longo, também exibiu atividade anti-HIV, pelo um mecanismo de inibição da transcriptase reversa (Majee & Biswas, 2013).

#### **2.5.1.4. Toxicidade Aguda vs Toxicidade Crónica no Homem**

A ingestão oral, de plantas ou sementes que possuam níveis de lectinas consideráveis, podem trazer toxicidade para quem as ingere. A maioria dos casos reportados de efeitos adversos tóxicos, com toxicidade aguda associada, deve-se a envenenamentos acidentais. Um desses casos, conhecido à largos anos, é o da ingestão de sementes de rícino, que contém níveis consideráveis de lectina rícina, uma lectina RIP tipo 2, proteína inativadora ribossomal e consequentemente inativadora da síntese protéica, pode mesmo provocar a morte de quem a ingere, exibindo uma LD50 de 20 mg/Kg peso corporal.

A potencial toxicidade de uma lectina depende da concentração da sua forma biologicamente activa na dieta alimentar, ao nível de alimentos crus ou processados e, da manutenção da sua forma biologicamente activa ao nível do tracto gastrointestinal, sendo que muitas delas são resistentes ao pH gástrico, mantendo a sua conformação nativa e exibindo atividade.

As lectinas podem ser consideradas fatores antinutricionais devido à sua toxicidade inerente. Apresentam resistência a enzimas digestivas e bactérias, podendo representar uma ameaça quando ingeridas por animais e pelo homem, interagindo e ligando-se ao trato digestivo superiores, inibindo o normal desenvolvimento e crescimento e causando diarreia, vômito e até morte.

Cerca de 90% das lectinas passam pelo tracto digestivo e intestinal, intactas na sua forma imunológica. Como resultado o seu valor nutricional é muito baixo, só aumentando quando se tornam inactivas, podendo, neste caso, serem comparadas a proteínas de reserva como as globulinas ou albuminas.

Mecanicamente, a toxicidade das lectinas consiste na ligação a recetores glicosilados

na membrana celular das vilosidades intestinais, desencadeando processos inflamatórios com internalização. No caso de ser uma lectina tipo RIP inibe a síntese de proteínas e a ativação das vias apoptóticas, provocando morte celular, com consequente falência orgânica.

Em indivíduos com relativa sensibilidade, as lectinas podem induzir danos intestinais graves que interrompem e comprometem a digestão, induzem o aparecimento de anticorpos IgG e IgM responsáveis por alergias alimentares e, em casos extremos, podem causar anemia, razão pela qual os sistemas de administração de medicamentos à base de lectinas nunca devem ser usados em pessoas com alergias alimentares relatadas (Majee & Biswas, 2013).

Como a capacidade das lectinas de causar má absorção intestinal depende da presença de bactérias entéricas, têm-se colocado a hipótese de que as lectinas também podem produzir toxicidade, facilitando o crescimento bacteriano no trato gastrointestinal (Dolan *et al*, 2010). A especificidade das lectinas de leguminosas para alguns glicanos de origem animal, comprova ainda mais a ideia de que as lectinas de leguminosas desempenham um papel na defesa das plantas contra insetos e / ou animais predadores.

## **2.6. Bioaplicação das Lectinas**

A amplitude de aplicação das lectinas é variada e muito abrangente, permitindo a sua aplicação em diversas áreas essenciais: Medicina, Biologia Celular e Bioquímica e Biotecnologia.

Na Medicina, a aplicação centra-se na deteção de doenças relacionadas com alterações de síntese dos glicanos; com estudos da malignidade (quantificação e discriminação de aberrações glicómicas da superfície celular); terapêutica antitumoral; tipagem sanguínea, deteção e quantificação de biomarcadores de diagnóstico, para despiste etiológico de diferentes patologias. Na Biologia Celular, as lectinas são usadas no fracionamento de populações celulares; servem de substrato para estudos de agregação e adesão celular; participam na avaliação dos mecanismos envolvidos na glicosilação correcta (mediante lectinas resistentes a variantes celulares). Na Bioquímica, lectinas purificadas, permitem fazer a deteção de epítomos glicosilados; a caracterização de glicanos, permitindo fazer uma análise glicómica e a descodificação de glicomas celulares; a quantificação de actividades de glicosiltransferases/glicosidasas, baseando na detecção de produtos

formados pela reação enzimática e, ainda a quantificação de lectinas associadas a glicoconjugados reativos (Rüdiger & Gabius, 2001).

### **2.6.1. No Diagnóstico**

As lectinas de plantas presentes na natureza, são extraídas principalmente dos órgãos de reserva, mas também de outros órgãos como as folhas, que após a sua purificação apresentam bioatividade, com aplicação na área da biotecnologia e da biomedicina (Vega & Perez, 2006), pela sua capacidade de ligação específica a hidratos de carbono. É esta afinidade que confere às lectinas um papel tão importante e específico, tornando-as uma ferramenta de precisão ao nível das suas aplicações biomédicas. A título de exemplo, a lectina da semente da *Salvia bogotensis* exhibe afinidade para o antigénio Tn, encontrado em células tumorais, permitindo a sua identificação, suportando a sua importância ao nível do diagnóstico (Vega & Perez, 2006). A especificidade das lectinas, permite que sejam utilizadas a nível clínico, quando acoplada a um fluorocromo, na marcação e visualização *in loco* (imagiologia) do tecido tumoral, na estimulação de macrófagos para inibição da proliferação de células leucémicas, e até mesmo, indução da resposta mitógena.

A capacidade que as lectinas têm de se ligarem especificamente a recetores glicosilados das membranas de linhas celulares malignas, por reconhecimento das anomalias glicómicas introduzidas nestas, faz das lectinas uma ferramenta bioadesivas na distribuição de fármacos, com grande potencial a nível do diagnóstico e terapêutica (Gabor *et al*, 2001).

Devido às suas propriedades, as lectinas têm sido utilizadas em diversos campos da saúde como a fisiologia, a bioquímica e as ciências biomédicas. A capacidade que as lectinas têm de reconhecer células tumorais de diferentes etiologias, com descodificação do seu glicoma, tornam a oncologia um campo de estudo promissor para aplicação das lectinas.

### **2.6.2. Na Terapêutica**

Para além do reconhecimento, várias lectinas possuem também atividades biológicas que evidenciam benefício, entre as quais atividade antitumoral e hipoglicemiante.

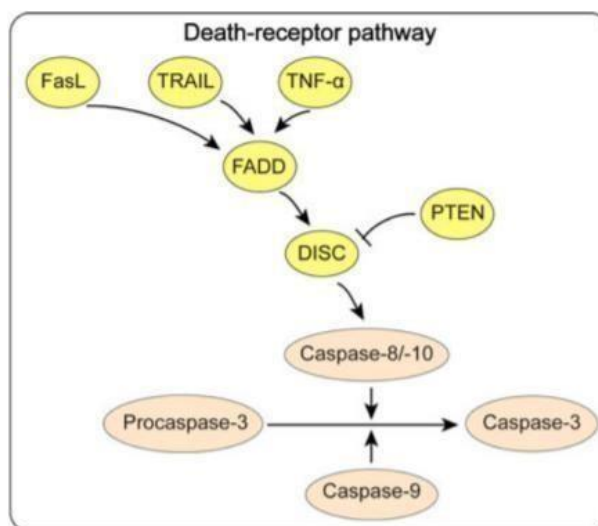
### 2.6.2.1. Atividade Antitumoral

As aplicações terapêuticas das lectinas são, a par das aplicações diagnósticas, de grande importância. São ferramentas poderosas nos estudos imunológicos e podem ser utilizadas como marcadores imuno-histoquímicos no diagnóstico do cancro e na caracterização dos tipos de superfície celular devido à expressão de glicanos aberrantes, característica das células malignas (Majee & Biswas, 2013).

Assim, as lectinas podem ser frequentemente utilizadas como uma espécie de sondas de diagnóstico e marcadores de superfície específicos de células tumorais. A sua actividade anticancerígena parece estar relacionada com a sua actividade de ligação específica às células com alterações glicómicas a nível membranar, através da identificação dos hidratos de carbono de superfície das células tumorais e depois atuando como citotoxinas, causando apoptose na via mitocondrial, através do aumento do conteúdo de espécies reactivas de oxigénio (ROS), desencadeando autofagia ou necrose nas células alteradas (Majee & Biswas, 2013). É importante salientar que esta vertente de utilização das lectinas no diagnóstico e terapêutica oncológica pode ser melhorada através da conjugação das referidas lectinas com agentes-alvo melhorando a sua especificidade e capacidade de ligação a determinada aberração glicómica, podendo as lectinas também ser utilizadas como agentes-alvo per si. Além disso, muitas lectinas com propriedades antitumorais possuem geralmente baixa citotoxicidade para células não malignas, uma vez que não expressam aberração glicómica na membrana celular. Muitos estudos têm relatado a actividade anticancerígena das lectinas.

Várias lectinas de plantas, tais como a concanavalina A, proveniente da *Canavalia ensiformis*, tem gerado crescente atenção pelas suas capacidades antiproliferativas e antitumorais em relação a vários tipos de células cancerígenas. Indução do apoptose (sobreexpressão das caspases 8 e 9), autofagia, antiangiogénese e imunomodulação são os mecanismos antitumorais demonstrados por esta lectina (Li *et al*, 2011). A concanavalina A extraída de sementes de feijão induz apoptose dependente da caspase em células de melanoma humano A375 (Yau *et al*, 2015), efeitos antiproliferativos e citotóxicos das lectinas de feijão tepário nas linhas de células C33-A e Sw480 (Valadez-Vega *et al*, 2011) (Figura 11 e 12). Outra lectina com atividade antiproliferativa é a lectina do *Viscum album* (MLs), sendo as do tipo RIP II as mais estudadas (Seifert *et al*, 2008). Estas lectinas dividem-se em três tipos distintos (ML-I; ML-II e ML-III), glicoproteínas heterodiméricas, constituídas por uma cadeia A de 3 domínios e uma cadeia B de 2

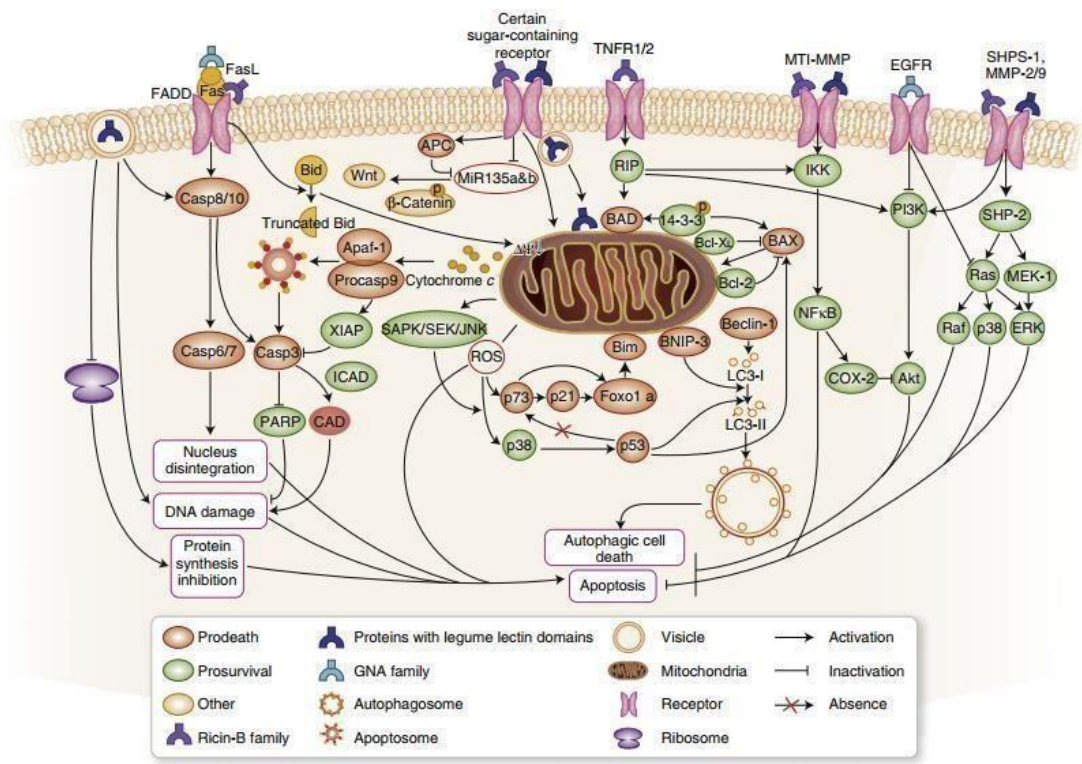
domínios, com atividade de lectina (Thies *et al*, 2005), interagindo esta última com certos açúcares ou cadeias de açúcares existentes à superfície da célula maligna, permitindo a internalização da cadeia A, que ao libertar-se no citosol irá inibir a síntese proteica intracelularmente através de inibição ribossomal, com consequente paragem da síntese proteica da célula (Hoessli e Ahmad, 2008).



**Figura 11-** Indução de sinalização dos recetores de morte, via extrínseca por lectinas (Fu *et al*, 2011)

A adesão celular é extrema importância na evolução do cancro e na metastização pois, uma vez na corrente sanguínea, as células tumorais têm a capacidade de adesão a outras células noutras partes do organismo, dando origem a metástases (Valadez-Vega *et al*, 2011).

Ao contrário das lectinas vegetais, as lectinas animais endógenas que possuímos, desempenham um papel importante na adesão celular, podendo facilitar a metastização. O uso de lectinas exógenas, por terem capacidade para inibirem esse processo de adesão e consequente metastização, através da sua ligação às membranas das células tumorais, pela indução de efeitos citotóxicos nas células com glicomas aberrantes, com indução da apoptose e alteração da síntese proteica, irão dificultar o processo de metastização, mediado por lectinas, podendo melhorar-se o prognóstico, impedindo a evolução das doenças cancerígenas (Figura 12).



**Figura 12-** Indução da morte celular cancerígena mediada por lectina através de uma rede de sinalização da morte celular programada (Dennis S., 2018)

**2.6.2.2. Atividade Hipoglicemiante**

A atividade antitumoral é, como vimos, um campo cada vez mais estudado e uma aposta cada vez mais segura no que à interpretação de mecanismos de citotoxicidade das células cancerígenas diz respeito, abrindo cada vez mais horizontes a nível terapêutico. A atividade de lectina a nível do controlo dos níveis de glucose é, também, uma área abrangente e que cada vez mais centra atenção por parte da investigação, com o principal objetivo de se desvendar quais os mecanismos pelos quais algumas lectinas possuem atividade hipoglicemiante. Esses mecanismos, ainda que com informação muito recente, assim como as lectinas que demonstram ter potencial, serão alvo de especial atenção nesta monografia (Capítulo III) (Dennis S., 2018).

## Capítulo III

### 3. Diabetes mellitus

A DM é um crescente problema de saúde pública a nível mundial, podendo atribuir o caráter de uma das pandemias do século XXI, vinculando uma enorme carga financeira e questões políticas de cuidados médicos, que impõe uma grande necessidade de se desenvolverem estratégias terapêuticas complementares às instituídas, pois os números que se fazem sentir são indicativos que a terapia convencional, por si só, tem sido incapaz de controlar todos os aspetos patológicos da doença (Brito *et al.*, 2016).

A Terapêutica convencional tem sido, como anteriormente descrito, baseada em princípios ativos de origem química, com as suas potencialidades e efeitos terapêuticos, mas ainda com muitos efeitos adversos e contraindicações associadas. A administração inadequada de insulina pode levar a uma hipoglicemia marcada e potencialmente grave, com consequente internamento com risco de vida associado, elevados custos para o SNS e a administração continuada de fármacos de origem sintética poderá resultar, mais uma vez, na ocorrência de efeitos adversos (Choudhary, *et al.*, 2012).

A DM pertence a um grupo de doenças de etiologia heterogénea, que se baseia numa hiperglicemia crónica e com outras anormalidades metabólicas que daí surgem, devidas ao défice de insulina produzida. Podem surgir complicações específicas devidas à DM como retinopatia, nefropatia e neuropatia, geralmente associadas a longos períodos de exposição a níveis de glucose plasmática descontrolados. A DM pode ter um caráter assintomático ou sintomático, com a polidipsia, poliúria, polifagia e perda de peso como principais manifestações sintomáticas, que podem progredir para cetoacidose e coma em situações de exposição temporal elevada sem intervenção terapêutica.

#### 3.1. Alterações Metabólicas na DM tipo 2

##### 3.1.1. Metabolismo dos Hidratos de Carbono

Quando é ingerida uma refeição rica em hidratos de carbono, a quantidade de glucose em excesso é armazenada nos tecidos na forma de glicogénio, que fica disponível para ser utilizado quando as necessidades energéticas estão aumentadas. O glicogénio é um

polissacárido constituído por vários monómeros de glucose unidos entre si por ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6, que é armazenado no fígado e nas células musculares. Este polímero ramificado pode, quando necessário, libertar um resíduo de glucose-1-fosfato do final de cada ramificação. Quando baixos níveis de glucose plasmáticos são atingidos, havendo necessidade, o glicogénio pode então ser degradado através do processo denominado de glicogénólise, ou sintetizado através da glicogénese (Nelson e Cox, 2008).

Os hidratos de carbono ao serem absorvidos no intestino, são apresentados às células na sua forma molecular mais comum, a glucose. É o substrato mais usado pelos tecidos e o principal usado pelo cérebro para obtenção de energia. O metabolismo da glucose quando se encontra comprometido, surgem anomalias metabólicas comuns, como a DM, contribuindo para situações graves, que comprometem a saúde, como aterosclerose, hipertensão, cegueira e doenças renais. Outros monossacaridos como a frutose, a galactose e a manose, podem ser degradados através de um processo metabólico chamado glicólise, dando origem a moléculas de glucose, sendo necessário para isso que sejam transformados em intermediários glicolíticos (Guyton *et al*, 2006; Brito *et al*, 2016).

A glucose pode nem sempre ser produzida através de substratos como os hidratos de carbono. Vários aminoácidos, lactato, piruvato, propionato e glicerol podem originar glucose, sendo este processo denominado de gluconeogénese. Ocorre principalmente no fígado e é uma via essencial para a sobrevivência de organismos. Dois importantes ciclos ou vias que ocorrem entre os tecidos e estão envolvidos na gluconeogénese são o ciclo de Cori (ciclo glucose-lactato) e o ciclo da alanina (ciclo glucose-alanina) (Devlin, 2006). É predominante o ciclo da alanina quando o piruvato ou a alanina são os precursores glucogénicos ou o ciclo de Cori no caso de sero lactato (Devlin, 2006).

### **3.1.2. Metabolismo da Insulina**

O pâncreas é um órgão constituído por 2 porções distintas: a porção exócrina e a porção endócrina. A porção exócrina é composta por ácinos que sintetizam o suco pancreático, constituído por várias enzimas digestivas, sendo à posteriori lançado no duodeno. O pâncreas endócrino é composto pelos Ilhéus de Langerhans, estruturas que segregam hormonas como a insulina e o glucagon, diretamente na corrente sanguínea, e que desempenham um papel fundamental para o metabolismo da glucose, dos lípidos e das

proteínas (Guyton *et al*, 2006; Brito *et al*, 2016). Existem cerca de um milhão de Ilhéus de Langerhans, organizados em torno de capilares e com quatro tipos diferenciados de células: células  $\alpha$  (produzem glucagon), células  $\beta$  (produzem a insulina); podendo estas variar em tamanho, número e função ao longo da idade do ser humano, células  $\delta$  (produzem somatostatina) e células PP (produzem péptido pancreático) (Brito *et al*, 2016).

As células dos ilhéus de Langerhans interagem entre si através do contacto direto das mesmas e do seu produto, as hormonas, que têm um efeito regulador entre si, modulando os aspetos celulares da nutrição, como a taxa de absorção dos alimentos para armazenamento celular ou o metabolismo dos nutrientes (Guyton *et al*, 2006).

A insulina humana é uma proteína, com atividade hormonal que, na sua forma biologicamente ativa e em circulação, se apresenta como um monómero composto por duas cadeias polipeptídicas, a cadeia A com 21 aminoácidos e a cadeia B com 30 aminoácidos (Gardner e Shoback, 2011), não sendo glicosilada. Estas cadeias estão ligadas por duas pontes, tendo a cadeia A uma ponte dissulfureto (S-S) interna (Gardner e Shoback, 2011).

A insulina é crucial no metabolismo de hidratos de carbono, de lípidos e proteínas em vários processos. A absorção e metabolismo da glucose pelas células do organismo, a prevenção da libertação de glucose a partir do fígado, a inibição da degradação e libertação dos lípidos, permitindo ainda que os aminoácidos entrem nos tecidos musculares e promovam a síntese proteica são alguns desses exemplos (Guyton *et al*, 2006; Gardner e Shoback, 2011).

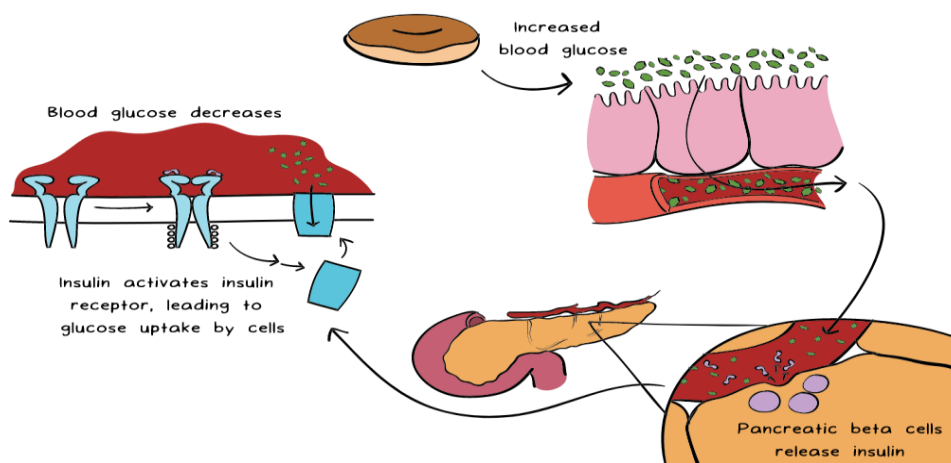
A secreção da insulina a partir das células  $\beta$  é principalmente estimulada pela glucose. A secreção da insulina ocorre em duas fases. A primeira ocorre em resposta ao aumento súbito da concentração de glucose, sendo libertada por um curto período de tempo uma grande quantidade de insulina. Caso a concentração de glucose se mantenha elevada, a libertação da insulina diminui gradualmente, voltando depois a aumentar até se manter constante (Gardner, e Shoback, 2011).

O transporte da glucose para o interior das células é feito por proteínas específicas designadas de transportadores de glucose (GLUT) (Olson, 2012). Existem diversos GLUT, mas só o GLUT-2, presente no fígado, intestino e rins, e o GLUT-4, presente no tecido adiposo e músculo esquelético, é que são dependentes da estimulação pela insulina,

permitindo o seu transporte. O GLUT-2 tem uma afinidade baixa para a glucose, aumentando assim o seu transporte quando os níveis desta no plasma estão elevados. Os GLUT-4 sofrem um processo de translocação no interior de vesículas para a membrana celular onde se fundem com a mesma e permitem assim a entrada da glucose para a célula, sendo removidos e armazenados quando os níveis de insulina diminuem.

A insulina exerce os seus principais efeitos biológicos através da ligação a um receptor na superfície da célula que após várias reações, levam à ativação de outras proteínas e outros substratos, bem como de moléculas sinalizadoras, estando todo este processo intrinsecamente ligado ao metabolismo dos vários nutrientes e aos efeitos da insulina no crescimento e proliferação celular (Gardner e Shoback, 2011; Cryer, 2012).

Participando no metabolismo e equilíbrio da Insulina, a somatostatina é um forte inibidor da insulina e do glucagon. A secreção de glucagon é estimulada pela diminuição dos níveis de insulina plasmática e é inibida pelo aumento do nível de glucose (Cryer, 2012).



**Figura 13-** Mecanismo de ação da insulina no metabolismo da glucose (Retirado de <https://pt.khanacademy.org/science/health-and-medicine/endocrine-system/diseases/diabetes/a/what-is-diabetes-mellitus>)

### 3.2. Terapêutica Convencional vs Terapêutica Alternativa

Nos últimos tempos, a aposta na Terapêutica não Convencional tem crescido a um ritmo intenso, captando a atenção de cada vez mais investigadores e até da própria indústria farmacêutica, que tem investido em estudos e ensaios clínicos, com vista a ter nos

compostos com bioatividade proveniente de plantas, uma vertente de investigação no combate a esta pandemia que é a DM.

### **3.2.1. Terapêutica Convencional**

O controlo da DM caracteriza-se por níveis de glicémia dentro de limites determinados, o mais próximos possível da normalidade, bem como a manutenção de um peso, pressão arterial e perfil lipídico adequado. De acordo com vários fatores (idade, estilo de vida, duração da doença, comorbilidades associadas), definem-se um intervalo de valores de glicemia, que cada indivíduo deverá ter em jejum e no pós-prandial.

A American Diabetes Association recomendou que o objetivo do controlo glicémico inclua um nível de glicemia pré-prandial de 80 a 120mg/dL (4,4 a 6,7 mmol/L), um nível de glicemia na hora de dormir de 100 a 140 mg/dL (5,6 a 7,8 mmol/L), e um nível de HbA1c inferior a 7% (Knight K., 2005, American Diabetes Association 2019).

Para a monitorização da doença devem ser regularmente medidos os níveis de glucose no sangue (testes de glicémia capilar) assim como trimestralmente a determinação da HbA1c, a hemoglobina glicada (Simonson *et al*, 1984). A terapêutica da DM, para além da vertente farmacológica imprescindível, deverá ter sempre presente associada a vertente não farmacológica, pelo que os estilos de vida desempenham um papel fundamental no controlo desta patologia. O objetivo primordial do tratamento da DM baseia-se assim no controlo da glicémia minimizando os episódios de hiper ou hipoglicémia, a redução sintomatológica, a prevenção de futuras complicações e a melhoria da qualidade de vida do diabético (Goldberg *et al*, 2005).

A adoção de uma dieta equilibrada, a não ingestão excessiva de álcool ou tabaco e a prática regular de exercício físico, e caso estes não permitam isoladamente o controlo da doença, a terapêutica com fármacos que reduzam os níveis de glucose em circulação, incluindo assim a administração de insulina (na DM tipo 1) e/ou fármacos anti-hiperglicémicos/hipoglicemiantes orais (na DM tipo 2), compõem a terapêutica dita convencional para esta doença (Fauci *et al*, 2009). Conforme referido anteriormente, a DM divide-se em 3 tipos, sendo a abordagem terapêutica dos dois tipos principais da doença distinta.

Na DM tipo 1 recorre-se quase exclusivamente à insulino terapia, ou seja, à reposição de insulina via externa à produção pelo organismo, sendo administrada maioritariamente por via subcutânea, uma vez que não resiste à passagem no trato gastrointestinal, contribuindo este facto para o insucesso na adesão terapêutica (Oliveira & Milech, 2004). A insulino terapia é classificada de acordo com a sua duração de ação, em insulinas de ação curta, intermédia ou longa. Esta hormona sintética, administrada em períodos estratégicos, irá desempenhar as funções fisiológicas da insulina humana no organismo, mimetizando o perfil de libertação desta hormona pelas células  $\beta$  pancreáticas (Papadakis *et al*, 2013). Assim em função da sua duração de ação irá cobrir as necessidades basais ou prandiais de insulina (Brutsaert, 2017).

Em relação à DM tipo 2, os fármacos anti-hiperglicémicos/hipoglicemiantes orais são a primeira linha da terapêutica, podendo em casos avançados ser considerada válida de combinação com esta terapêutica a insulino terapia. Estão atualmente disponíveis várias classes de fármacos orais, em função do seu mecanismo de ação, que são usadas em monoterapia, terapêutica dupla ou terapêutica tripla (Papadakis *et al*, 2013; Brutsaert, 2017):

-Na classe de fármacos que estimulam a secreção de insulina, destacam-se as sulfonilureias como a glibenclamida, glicazida, glipizida e glimepirida;

-Na classe de fármacos que reduzem os níveis de glucose em resultado da sua ação ao nível hepático, muscular e tecido adiposo onde se incluem as biguanidas como a metformina e as tiazolidinedionas (TZD) ou glitazonas como a rosiglitazona e a pioglitazona;

-Na classe de fármacos que atuam na absorção de glucose como os inibidores das  $\alpha$ -glucosidases intestinais onde se destaca a acarbose;

-Na classe de fármacos que mimetizam o efeito das incretinas ou prolongam a sua ação onde se incluem os inibidores da dipeptilpeptidase IV (DPP-4) como a sitagliptina, a vildagliptina, a saxagliptina e a linagliptina;

-Na classe de fármacos que são inibidores dos co-transportadores de sódio e glucose tipo 2 (SGLT2) como a dapagliflozina.

### **3.2.2. Terapêuticas Alternativas: Fitoterapia**

Nas últimas décadas, diversas alternativas à terapia “química” e convencional têm sido consideradas como válidas no combate e tratamento da DM, nomeadamente com o uso de fitoterápicos, aproveitando os seus benefícios terapêuticos e menor risco de reações adversas como a hipoglicemia, reação adversa característica da terapêutica convencional (Borges, *et al.*, 2008).

A OMS listou cerca de 21.000 plantas que são utilizadas para fins medicinais em todo o mundo, das quais 800 foram notificadas e estudadas por demonstrarem ter potencial antidiabético (Rizvi e Mishra, 2013).

Compostos Fenólicos, Alcalóides, Proteínas de Reserva de Leguminosas e, principalmente as Lectinas, presentes em diversas plantas e em diferentes órgãos, participando, alguns deles, na dieta alimentar, demonstraram nos últimos anos, em alguns estudos, possuírem atividade hipoglicemiante.

A bioatividade das plantas está relacionada com a composição química dos seus produtos constituintes, denominados compostos bioativos, já amplamente referidos nesta monografia, que apresentam efeitos benéficos para a manutenção de um estado saudável. Estes fitoconstituintes, parecem executar mecanismos de ação que baixam os níveis de glucose no sangue. Esses mecanismos são variados, ainda não totalmente compreendidos, tais como: o aumento da libertação de insulina pelas células- $\beta$  pancreáticas; a resistência às hormonas que aumentam a glicemia (glucagon e somastatina); aumento do consumo glicémico pelos tecidos e órgãos; possível poder estimulante da regeneração das células- $\beta$  (Patel *et al.*, 2012); aumento do efeito inibidor contra a enzima insulinase; aumento da síntese de glicogénio hepático ou diminuição da glicogenólise; inibição da absorção intestinal da glucose e, expressão aumentada dos transportadores da glucose, são alguns dos possíveis mecanismos resultantes do uso de fitoconstituintes (Patel, *et al.*, 2012).

Como sabemos, a dieta mediterrânica, contempla o consumo frequente de legumes, fruta, vegetais, sementes de algumas plantas e leguminosas, contribuindo diretamente para a

diminuição da prevalência de patologias crónicas, tais como as doenças cardiovasculares e também a DM.

### 3.2.2.1. Proteínas de Reserva de Leguminosas

Para além das lectinas, outros compostos bioativos como as proteínas de reserva de leguminosas, também demonstraram possuir efeito hipoglicemiante. Diferentes estudos têm reportado efeitos benéficos de diversos compostos bioativos presentes em leguminosas, como por exemplo a soja, o fenogrego, feijão, ervilhas amarelas, assim como o tremçoço, no controlo dos níveis de glucose diz respeito.

O tremçoço, género *Lupinus*, além da  $\gamma$ -conglutina, exhibe, entre as globulinas, a  $\beta$ -conglutina, assim como outras proteínas de reserva, tendo demonstrado igual efeito benéfico no controlo dos níveis de glucose plasmáticos (Guzman *et al*, 2021).

Guzman *et al* (2021), mostraram que a  $\beta$ -conglutina, homólogo proteico da  $\beta$ -conglucina também induz diminuição da glicémica, com uma maior sensibilidade celular para a insulina.

A importância destas proteínas influencia a sobreexpressão do transportador de glucose GLUT4, altamente presente no músculo esquelético, aumentando também o recetor de substrato de insulina (IRS-2) nas células hepáticas (Tachinana *et al*, 2014).

Para além dos potenciais efeitos descritos acima, a  $\beta$ -conglutina atua sobre outros alvos proteicos entre as quais a DPP-IV. A inibição desta enzima, que degrada as incretinas libertadas pelos enterócitos, contrabalança o seu efeito indutor de ação insulínica, levando a níveis de glucose superiores, aumentando também com isso a resistência insulínica (Lammi *et al*, 2016 e Lammi *et al*, 2018).

A inibição desta enzima (DPP-IV) por este polipéptido ( $\beta$ -conglutina) pode implicar um efeito bastante benéfico nos níveis de glucose pós-prandiais, devido ao aumento do tempo de semi-vida das incretinas e consequentemente na produção e resposta insulínica (Guzman *et al*, 2021). Este facto é importante pois é reconhecido o papel da hiperglicemia desempenha um papel crítico no desenvolvimento de disfunção das células endoteliais dos nossos vasos, no stress oxidativo e nos estados inflamatórios que se verificam nesta condição, envolvendo temporalmente para uma relação direta com eventos

cardiovasculares (Guzman *et al*, 2021), tornando estes compostos com uma bioatividade e alvo de estudos cada vez maior.

Outro alvo da  $\beta$ -conglutina, aparenta ser a modulação genética. A administração deste polipéptido por longos períodos está relacionada com o aumento da expressão do gene cinase glicogénio sintase (adiante Gsk3b) que expressa a respetiva proteína quinase de igual nome, reconhecido hoje em dia como um regulador negativo da cascata sinalizadora da insulina, mas não só, tendo também importante papel na síntese de glicogénio, aumentando-o, além de influenciar outros processos biológicos, como o ciclo celular, apoptose e também processos inflamatórios associados assumindo-se assim como um importante alvo para possíveis terapêuticas futuras da DM (Guzman *et al*, 2021).

### **3.2.2.2. Compostos Fenólicos e Alcalóides**

Os compostos fenólicos, extraídos de plantas, podem inibir a absorção da amilase, auxiliando no tratamento de patologias onde se verificam défices de absorção de hidratos de carbono, como a diabetes (Sales *et al*, 2012). Muitas frutas e vegetais que contêm compostos fenólicos, como as uvas, bagas e tomates demonstraram ser benéficos para a saúde reduzindo o risco de síndrome metabólico e complicações relacionadas com a diabetes tipo 2 (Lin *et al*, 2016).

O oxigénio reactivo (ROS) e as espécies reactivas de azoto (RNS) são moléculas oxidadas altamente reativas, que são geradas constantemente pelas condições celulares normais, por exemplo, a actividade da cadeia respiratória mitocondrial e no processo inflamatório, o que poderia levar a danos noutras cadeias biológicas e moléculas, como DNA (Halliwell *et al*, 2002; Lea *et al*, 2015). As enzimas antioxidantes, responsáveis por controlar estes radicais e estabelecerem um equilíbrio que não seja lesivo, incluem a superóxido dismutase (SOD), a glutatíão peroxidase (GPx) e catalase (CAT), desempenhando um papel vital na eliminação destes oxidantes e conseqüente prevenção de lesões celulares.

Os polifenóis, especialmente flavonóides e ácidos fenólicos, têm a importante propriedade de inibir as enzimas  $\alpha$ -glucosidase e  $\alpha$ -amilase, que são enzimas-chave responsáveis pelo metabolismo dos hidratos de carbono dietéticos, a glucose (Lin *et al*, 2016)

Os polifenóis vegetais dietéticos modulam o metabolismo dos hidratos de carbono e dos lípidos, atenuam a hiperglicemia, a dislipidemia e a resistência à insulina, melhoram a função das células  $\beta$  pancreáticas, estimulando assim o aumento de secreção de insulina, melhoram o metabolismo dos tecidos adiposos e diminuem o stress oxidativo, as vias de sinalização sensíveis ao mesmo e os processos inflamatórios (Lin *et al*, 2016).

Os compostos polifenólicos também podem prevenir o desenvolvimento de complicações a longo prazo da DM, incluindo doenças cardiovasculares, neuropatia, nefropatia e retinopatia.

Há evidência, baseada em trabalhos científicos que demonstraram que o pequeno fruto carmesim (cor vermelho forte) de *Viburnum dilatatum* tem uma forte actividade antioxidante, sendo o ácido cianidina-3-sambubiosídeo (C3S) e ácido cafeoilquímico (5-CQA) identificados como compostos activos, demonstraram inibição dose-dependente, da concentração de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase (Lin *et al*, 2016).

Em suma, estes efeitos são atribuídos em geral à capacidade dos compostos fenólicos para reduzir, neutralizar e também reparar danos resultantes do stress oxidativo e da inflamação associada à DM.

Um conhecido composto fenólico, o resveratrol (3,4,5-tri-hidroxistilbeno), tem propriedades benéficas ao nível de melhoria da tolerância à glucose, demonstrando ter actividade benéfica, atenuando a redução das células  $\beta$  e reduzindo o stress oxidativo na ilheus de Langherans, encontrando-se maioritariamente nas uvas, vinho, sumo de uva, amendoins e bagas (Szkudelski *et al*, 2011). Além disso, os compostos polifenólicos podem aumentar a actividade catalítica da fosforilação da glucose.

Outra actividade que os compostos fenólicos exibem é a inibição da expressão do gene indutor do óxido nítrico sintetase e inibir a actividade do factor de transcrição NF-kB. Portanto, os radicais livres de óxido nítrico (NO) podem ser evitados, observando-se efeito protetor da linha de células pancreáticas (Lin *et al*, 2016).

Os compostos polifenólicos também são capazes de regular os valores de glicemia pós-prandial e inibir o desenvolvimento de resistência à glucose, através da promoção da resposta insulínica e diminuição da secreção do polipeptídeo insulino-trópico glucose-dependente (GIP) e glucagon-like polipéptido-1 (GLP-1) (Johnston *et al*, 2005; Deal *et al*, 2011).

Alguns alcalóides como a berberina, boldina, lupanina, neferina, oxymatrina, piperina, e sanguinarina têm sido estudados pela sua actividade antidiabética. Christodoulou *et al.* (2019), discutiram o impacto antidiabético de certos alcalóides, direccionando-o para os seus alvos moleculares ao longo da via de sinalização da insulina. Neste estudo, ensaios *in vitro* e *in vivo* apoiam os efeitos benéficos da berberina, trigonelina, piperina, oximetria, vindoneline, evodiamina, e neferina na sinalização insulínica e em cascatas reacionais relacionadas com as células  $\beta$ , miócitos, adipócitos, hepatócitos, e outras células (Christodoulou *et al.*, 2019).

A berberina é um alcalóide pertencente à classe das isoquinolinas, sendo isolada de plantas medicinais de *Berberis* (Berberidaceae). A sua actividade anti-hiperglicémica baseia-se, diminuição da absorção da glucose (Pan *et al.*, 2003). A berberina está relacionada coma inibição da  $\alpha$ -glucosidase, diminuindo o transporte de glucose através do epitélio intestinal, aumentando o re-uptake da mesma (Pan *et al.*, 2003; Gaikwad, 2014).

Para além da sua ação anti-hiperglicemiante, a berberina possui um interesse particular na prevenção e controlo de doenças cardiovasculares devido a potentes propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, e de redução dos lípidos (Cicero & Baggioni 2016).

Boldina é um alcalóide da classe benzilisoquinolina, sendo isolada de *Peumus boldus molina* (boldo chileno Monimiaceae) (Oza & Kulkarni, 2016). A boldina demonstrou melhorar a função endotelial em ratos diabéticos nalguns estudos, através de inibição da angiotensina II mediada pelo fator BMP4 em cascata de stress oxidativo. Isto reduz a sobreprodução de ROS ao inibir a expressão BMP4 estimulada por Ang II (Lau *et al.*, 2013).

Lupanine é um alcalóide da classe quinolizidina, isolado da espécie *Lupinus*, particularmente de *Lupinus perennis*. Aumenta a secreção de insulina (Lopez *et al.*, 2004). Recentemente, Wiedemann *et al.* (2015) mostraram como lupanina melhora a homeostase da glucose influenciando os canais de potássio sensíveis ao ATP (KATP).

Oxymatrine é outro alcalóide, pertencente à classe das quinolizidinas obtido a partir da raiz de *Sophora flavescens* (família Fabaceae). Diminui a glicemia, a excreção de proteínas urinárias e de albumina, creatinina sérica, e compostos azotados no sangue num modelo de estreptozotocina de dieta rica em gorduras DM T2, num modelo de nefropatia

dose oral de 150 mg/kg por dia durante 11 semanas (Guo *et al*, 2014; Oza & Kulnarni, 2016).

A piperina é um alcalóide natural presente nos frutos da espécie Piper. Tem efeitos bioestimuladores idêntica à metformina na redução dos níveis de glucose no sangue (Atal *et al*, 2016).

A sanguinarina é um alcalóide de benzofenantridina; é um excelente intercalador de ADN e ARN. Os alcalóides e os compostos fenólicos são, portanto, compostos bioativos extraídos de plantas com cada vez maior utilização e estudo, no que às alternativas terapêuticas para a DM diz respeito, demonstrando eficácia em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. Nem todos os mecanismos e vias de atuação destes compostos estão esclarecidos, no entanto, as que já se conhecem e que já foram abordadas, são excelentes indicadores e alvos claros da terapêutica futura da DM, cada vez mais centrada na Fitoterapia.

### 3.2.2.3. $\gamma$ -Conglutina: Lectina do *Lupinus albus*

Nos últimos anos, tem sido atribuída grande relevância a uma planta do género Lupinus, a planta do Tremoço, devido aos seus efeitos benéficos ao nível do controlo da glicemia e também de outros parâmetros bioquímicos, como o colesterol sérico. Os alcalóides, as proteínas de reserva e as lectinas estão igualmente presentes nas sementes e órgãos desta planta, apoiando a sua crescente importância nesta área.

O Tremoço é uma leguminosa cultivada mundialmente e consumida de igual forma, desde há muitos anos em diversas regiões (Guzman *et al*, 2021).

A  $\gamma$ -conglutina, uma lectina bastante documentada, tendo demonstrado em vários estudos *in vitro* e *in vivo*, ter uma ação hipoglicemiante. Esta lectina, bem presente nas sementes de tremoço do *Lupinus albus* mostrou ter efeito hipoglicemiante, dose-dependente e com exposição continuada (Bertoglio *et al* 2011, Grácio *et al*, 2021, Guzman *et al*, 2021).

O mecanismo pelo qual esta proteína exerce o seu efeito benéfico ao nível do controlo da glicemia ainda não está completamente esclarecido, e só um deles (Grácio *et al*, 2021) relacionou ainda, o carácter de lectina desta proteína, com a sua bioatividade mas, vários estudos apontam para potenciais mecanismos celulares e moleculares responsáveis por

este efeito, entre os quais inibição enzimática, sobreexpressão de transportadores e ligação à insulina (Magni *et al.*, 2005, Munoz *et al.*, 2018), assim como ligação aos recetores glicosilados das células HepG2 (Grácio *et al.*, 2021), entre outros. Parece ainda, que alterações estruturais na molécula da  $\gamma$ -conglutina, não influencia a sua ligação à insulina (Grácio *et al.*, 2021).

São vários os mecanismo hipoglicemiantes, apontados para a  $\gamma$ -conglutina: inibição da DPP-IV, estimulação do transporte da molécula de glucose pelo Glut-4 (recetor presente na superfície celular) até aos recetores da insulina e inibição da gluconeogénese hepática (Munoz *et al.*, 2018):

#### **3.2.2.3.1. Inibição da DPP-IV (Dipeptidil Peptidase-IV)**

A DPP-IV é uma enzima expressa na superfície da maioria das células que desativa uma variedade de outros peptídeos bioativos, incluindo o polipeptídeo gastrointestinal insulínico (GIP) e o GLP-1. Portanto, a sua inibição pode potencialmente afetar a regulação da glucose através de múltiplos efeitos. No entanto, os inibidores de DPP-IV têm um efeito modesto sobre os níveis de GLP-1 em comparação com agonistas do GLP1.

Em vários estudos com  $\gamma$ -conglutina, Munoz *et al.*, (2018), demonstraram que esta lectina apresenta altos níveis de inibição desta enzima, com relação dose-efeito evidente, comparável com os inibidores sintéticos da enzima DPP-IV, como a Sitagliptina. A estrutura peptídica parece ligar-se à DPP-IV, diminuindo os níveis de glucose plasmáticos.

#### **3.2.2.3.2. Sobreexpressão do GLUT-4 Membranar**

A absorção aumentada de glucose para as células, parece ser mediada pelo transportador GLUT-4, proteína de transporte codificada pelo gene SLC2A4, abundante nas membranas celulares do músculo esquelético, cardíaco e tecido adiposo. A presença de lectinas como a  $\gamma$ -conglutina estimula o transporte de glucose desde a circulação plasmática, através da membrana plasmática celular, para o interior das células, através deste transportador, numa razão mais uma vez dose-dependente (Munoz *et al.* 2018).

### 3.2.2.3.3. Inibição da Gluconeogénese Hepática

A lectina  $\gamma$ -conglutina demonstrou ter a capacidade para diminuir os níveis de produção de glucose pelas células HepG2 hepáticas, a par com a utilização de metformina, antidiabético sintético (Munoz *et al*, 2018). Uma das características da DM, especialmente da DM Tipo 2 é a anormal produção de glucose a nível das células hepáticas (gluconeogénese) (American Diabetes Association 2019).

Determinadas enzimas, como a glucose-6-fosfatase (G6Pase) e a fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCK), auxiliam na manutenção do processo de gluconeogénese normal (American Diabetes Association 2019). Estas enzimas encontram-se ativas em doentes diabéticos, levando à produção e libertação no plasma de elevados níveis de glucose.

Os últimos estudos apontam para que a diminuição do processo neoglucogénico a nível das células hepáticas esteja relacionada com a sobreexpressão de alguns genes que regulam a transcrição destas mesmas enzimas, ao nível do próprio mRNA.

### 3.2.2.3.4. Diminuição da Resistência à Insulina

Ao longo dos anos, a biologia molecular da DM tem sido estudada em diferentes órgãos para compreender a fisiopatologia dos mecanismos biológicos que conduzem a esta complexa doença metabólica. O fígado é um dos principais órgãos que controla os níveis e a produção de glucose, mas também o metabolismo lipídico, estando a sua função alterada nos doentes com DM, geralmente relacionado com a resistência à insulina (Loria *et al*, 2013). Várias vias metabólicas estão alteradas nesta patologia, sendo a inibição da sinalização da insulina uma das dessas vias mais importantes devido ao papel crucial que esta hormona desempenha na homeostase da glucose. A este respeito, as c-Jun N-terminal quinases (JNKs) são algumas das proteínas envolvidas na resistência insulínica que têm merecido atenção de diversos investigadores (Kaneto, 2005; Solinas e Karin, 2010; Solinas e Becattini, 2017). As JNK constituem um grupo de cinases serina-treoninas pertencentes à família das cinases proteicas activadas por mitogénio (MAPKs) (Chang e Karin, 2001). A sua presença está confirmada em diferentes tipos de células e tem como uma das principais funções a resposta a diversos factores de stress, tais como stress oxidativo, citocinas inflamatórias, entre outros, factores de stress esses que estão

aumentados e envolvidos na diabetes e obesidade (Kaneto, 2005; Solinas e Karin, 2010; Solinas e Becattini, 2017).

Sabe-se que a isozima c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) está envolvida nos processos que conduzem à DM. No fígado, a ativação de JNK1 contribui para o aumento da resistência à insulina, apoptose hepática, e inflamação das células hepáticas. Portanto, a sua inibição no fígado está relacionada com decréscimo dos valores de glicemia e melhorias na sensibilidade insulínica (Tarantino *et al* 2011).

A  $\gamma$ -conglutina, presente em sementes de várias espécies do género *Lupinus*, demonstrou também ter influência direta na inibição das proteínas cinases JNK, especificamente na ativação de JNK 1, sugerindo que a reduzida expressão genética e ativação proteica de JNK1, está diretamente envolvida no controlo dos níveis de glucose plasmáticos (Zepeda *et al*, 2021).

Neste estudo, verificou-se que a redução dos níveis de glucose com a  $\gamma$ -conclutina de *Lupinus Rotundiflorus* foi idêntica em relação a outros estudos, com outras espécies de *Lupinus*, indicando que esta lectina apresenta um mecanismo de ação idêntico, independentemente da espécie onde se encontra (Zepeda. *et al*, 2021).

A expressão de mRNA de *Jnk1* está sobreexpressa na DM, diminuindo com a administração de  $\gamma$ -conglutina, para níveis idênticos em casos em que a terapia antidiabética com Metformina foi utilizada (Zepeda. *et al*, 2021).

A expressão de JNK1 diminuída nos casos de administração da lectina  $\gamma$ -conglutina, parece representar um mecanismo viável pelo qual as lectinas podem exercer os seus efeitos hipoglicemiantes, reduzindo a resistência à insulina e tendo influência direta sobre as enzimas gluconeogénicas, sendo portanto estas proteínas um alvo terapêutico no controlo da DM.

#### 4. Conclusão

As lectinas têm grande potencial em termos de aplicações terapêuticas, sendo utilizadas em diversas áreas biomédicas, especialmente nas suas aplicações ao nível do controlo do flagelo de saúde pública que é a DM, mostrando ser um composto bioativo com um elevado potencial. A inovação terapêutica alcançada sobre doenças infecciosas, combinada com a melhoria geral das condições de vida e dos cuidados de saúde, a esperança de vida tem sofrido um aumento notório nas últimas décadas. Como tal, as doenças de carácter crónico, genético e relacionado com a idade e hábitos de vida, tornaram-se o principal foco dos estudos clínicos e da Indústria Farmacêutica, uma vez que representam agora um problema maior, diminuindo a qualidade de vida. A DM está referenciada já à algumas décadas como uma patologia ligada ao estilo de vida da população, ao conseqüente envelhecimento da mesma, encontrando-se no centro das atenções da OMS e da Comunidade Científica.

A utilização de lectinas extraídas de plantas foi sempre limitada pelo conhecimento das mesmas, associada à baixa implementação a nível terapêutico, sendo ainda uma área “naive”. À medida que a ciência tem evoluído, a inovação tecnológica e terapêutica aumentam o conhecimento permitindo a utilização dos compostos bioativos e mais especialmente, das lectinas, em áreas cada vez mais abrangentes. À medida que a nossa compreensão estrutural e do mecanismo de ação das lectinas cresce, o mesmo acontece com as aplicações com que as utilizamos. Quanto mais estudos forem realizados, mais interações específicas desconhecidas serão encontradas e mecanismos de acção aplicados ao tema da DM, ficarão disponíveis para serem utilizados e aplicados de forma adequada. O estudo e aplicação de lectinas tem aumentado a um ritmo espantoso nas últimas décadas. Desde os anos 60, com a percepção de que estas proteínas prontamente disponíveis são ferramentas inestimáveis para o estudo de hidratos de carbono tanto simples como complexos, em diferentes matrizes biológicas e na discriminação do glicoma celular com vista à sua caracterização. Embora a toxicidade das lectinas de plantas seja sempre uma preocupação, estudos *in vivo*, são esclarecedores do seu efeito benéfico, podendo sempre a sua toxicidade ser ultrapassada, mediante o emprego de *drug delivery systems*. Estudos recentemente efetuados (Grácio *et al*, 2021), revelaram alguma novidade na responsabilização do carácter de lectina, neste contexto, como a ligação da  $\gamma$ -conglutina aos recetores glicosilados das membranas das células HepG2, e ainda a

ligação à insulina, por um mecanismo diferente de lectina, uma vez que esta hormona não é glicosilada (Grácio *et al*, 2021).

O avanço drástico em todas as áreas da nossa vida, que a tecnologia proporcionou no século passado, e a evolução que está a ser evidente neste século, mostrou que os estudos neste campo irão certamente dar resultados muito satisfatórios, sendo de grande importância um maior investimento nesta área, o que certamente trará benefícios para os doentes com doenças crónicas como a DM.

## Referências Bibliográficas

Ambrosi, M., Cameron, N. R., & Davis, B. G. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(9), 1593. <https://doi.org/10.1039/b414350g>

American Diabetes Association (2019) Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 2019, 42 (Suppl. 1), S13–S28.

Andjelkovic, M, Camp, J.V., Meulenaer, B.D., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., Verhe, R. (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*, 98: 23-31.

Aniszewski (2015), T. Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology, and Applications; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands; ISBN 0444594620

Arab, M.R., S. Salari, M. Karimi, and H. Mofidpour (2010). Lectin histochemical study of cell surface glycoconjugate in gastric carcinoma using *Helix pomatia* agglutinin. *Acta Medica Iranica*, v. 48, p .209-213

Arif, T., Mandal, T.K., Dabur, R. (2011). Natural products: Anti – fungal agents derived from plants. Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry, 81, pp, 283 – 311

Atal, S.; Atal, S.; Vyas, S.; Phadnis, P. (2016). Bio-enhancing effect of piperine with metformin on lowering blood glucose level in alloxan induced diabetic mice. *Pharmacogn. Res.*, 8, 56–60.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203

Barata, J., (2008). *Terapêuticas alternativas de origem botânica - efeitos adversos e interações medicamentosas*. Lisboa: Lidel edições.

Bertoglio, J.C, Calvo, M. A, Hancke, J.L., Burgos, R.A., Riva, A., Norazzoni P., Duranti, M. (2011). Hypoglycemic effect of lupin seed gama-conglutin in experimental animals and healthy human subjects. *Fitoterapia*, 82, 933-938. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21605639>

Bhusan, M. *et al.*, (2010). An analytical review of plants for anti diabetic activity with their phytoconstituent and mechanism of action. *Internacional journal of pharmaceutical sciences and research*, Volume I.

Born, S.L., Api A.M., Ford, R.A., Lefever, F.R., Hawkins, D.R. (2003). Comparative metabolism and kinetics of coumarin in mice and rats. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 247-258.

Borges, K., Bautista, H. e Guilera, S., (2008). Diabetes-Utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. *Revista electrónica de Farmácia*, Volume II, pp. 12-20.

Boudet A-M. (2007). Evolution and current status of research of in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68: 2722-2735

Brito de Sá, A., Oliveira, C., Carvalho, D., Raposo, J., Polónia, J., Aranda da Silva, J., Medina, J. L., Gardete Correia, L., Silva Miguel, L., & Cernadas, R. (2016). A Diabetes Mellitus em Portugal: Relevância da Terapêutica Farmacológica Adequada. *Revista Portuguesa De Farmacoterapia*, 8(1), 44-53. <https://doi.org/10.25756/rpf.v8i1.93>

Brutsaert E., (2017). Diabetes Mellitus (DM) - Endocrine and Metabolic Disorders - Merck Manuals Professional Edition:  
<http://www.merckmanuals.com/professional/endocrine-andmetabolicdisorders/diabetes-mellitus-and-disorders-of-carbohydrate-metabolis/diabetesmellitus-dm>

Cassidy A. Kay C. (2013). Phytochemicals: Classification and Occurrence. *In: Caballero B, Allen L, Prentice A. (Ed.). Encyclopedia of Human Nutrition. Third Edition.* Elsevier, pp. 1388-1395

Cerqueira, F., Cidade, H., Van Ufford, L, Beukelman, C., Kijjoa, A., Nascimento, M.S.J.. (2008). "The Natural Prenylated Flavone Artelastin is an Inhibitor of ROS and NO Production", *International Immunopharmacology* , 8 (4), pp. 597 - 602. Chang L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 410(6824):37–40

Chiang, L.C., Chiang, W., Liu, M.C., Lin, C.C. (2003). *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, pp., 194 – 198.

Chirumbolo, S. (2010). The Role of Quercetin, Flavonols and Flavones in Modulating Inflammatory Cell Function. *Inflammation & Allergy – Drug Targets*, 9(3), pp. 1 – 23.

Choudhary, S. *et al.*, (2012). Comprehensive Evaluation of Anti-hyperglycemic Activity of Fractionated *Momordica charantia* Seed Extract in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

Chunglong, C., Song, L., Rongsu, L., Fengping, W., Junqin Li. (2008). Concentration of phenolic compounds of *Populus euphratica* and soil water contents in Ejina oasis, Inner Mongolia, China. *Acta Ecologica Sinica*, 28 (1): 69-75

Christodoulou, M.; Tchoumtchoua, J.; Skaltsounis, A.; Scorilas, A.; Halabalaki, M. (2019). Natural alkaloids intervening the insulin pathway: New hopes for anti-diabetic agents. *Curr. Med. Chem.*

Cicero, A.F.G.; Baggioni, A. (2016). *Berberine and Its Role in Chronic Disease*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland; Volume 928.

Coelho, L. C. B. B., Silva, P. M. D. S., Lima, V. L. de M., Pontual, E. V., Paiva, P. M. G., Napoleão, T. H., & Correia, M. T. D. S. (2017). Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: <https://doi.org/10.1155/2017/1594074>

Costa R. (2009). Avaliação do Potencial Antioxidante da Folha de *Cydonia oblonga* Miller. Monografia. Porto, Universidade Fernando Pessoa.

Cryer, P. (2012). Glucagon in the Pathogenesis of Hypoglycemia and Hyperglycemia in Diabetes. *Endocrinology*, 153 (2), p. 1-10.

Cunha, A. P., (2003). Aspectos históricos sobre plantas medicinais, os seus constituintes e Fitoterapia. In: *Plantas e produtos vegetais em fitoterapia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Cushnie, T., Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, pp. 343 – 356.

Damodarand, D., Jeyakani, J., Chauhan, A. (2008). Cancer Lectin DB: a database of lectins relevant to cancer. *Glycoconjugate Journal*. v. 25, p. 191-198.

Dao, T.M.; Waget, A.; Klopp, P, (2011). Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice: A mechanism which contributes to the glycemic control.

Dennis S., (2018) *Studies in Natural Product Chemistry*, Editor: Anneka Hess; Typeset by SPi Global, India

Devlin, T. M. (2006). *Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations*. Sixth Edition. Nova Jéršia, Wiley-Blackwell.

Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., Capasso, F. (1999). Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science*, Tucson, 65(4), pp. 337-353.

Dolan, L. C., Matulka, R. A., & Burdock, G. A. (2010). Naturally occurring food toxins. *Toxins*, 2(9), 2289–332. <https://doi.org/10.3390/toxins2092289>

Dom, Y.D.; Fu, L.D.; Jia, Y.P.; Du, X.J.; Wang, Q.; Wang, Y.H.; Zhao, X.F.; Yu, X.Q.; Wang, J.X. (2008). A hepatopancreas-specific C-type lectin from the *Chinese shrimp*, *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Molecular Immunology*, v. 45, p. 348-361,

Eidi, A.; Eidi, M.; Esmaeili, E. (2006). Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 13, 624–629.

Fauci A, Kasper D, Braunwald E, Hauser S, Longo D, Jameson J, (2009). Harrison's Manual of Medicine. 17 th Edit. The McGraw-Hill Companies, editor. United States;. 942-945.

Fu, L. L., Zhou, C. C., Yao, S., Yu, J. Y., Liu, B., & Bao, J. K. (2011). Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 43(10), 1442–1449

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.07.004>

Gabor, F., Klausegger, U., Wirth, M. (2001). The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. *International Journal of Pharmaceutics*, V.221, 35-47

Gabor, F.; Bogner, E.; Weissenboeck, A.; Wirth, M, (2004). The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 459-480.

Gaikwad, S.B.; Mohan, G.K.; Rani, M.S, (2014). Phytochemicals for diabetes management. *Pharm. Crop*, 5,11–28.

Gardner, D. G. e Shoback, D. (2011). Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology. 9<sup>a</sup> Edição. Nova York, The McGraw-Hill Companies, Inc.

Grácio, M.M.A., Rocha, J., Pinto, R., Solas, J., R., Ferreira, R.B., Figueira, E, Sepodes, B. and Ribeiro, A.C., ( 2021). A proposed lectin-mediated mechanism to explain in vivo anti-hyperglycemic activity of  $\gamma$ -Conglutin from *Lupinus albus* seeds. *Food Science and Nutrition*, 2021. Under review.

González, A. S. (2011) Citroflanoides como posible alternativa en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones. *Revista Mexicana de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 03, p. 17-26.

Guo, C.; Han, F.; Zhang, C.; Xiao, W.; Yang, Z (2014). Protective effects of oxymatrine on experimental diabetic nephropathy. *Planta Med.*, 80, 269–276.

Guyton, A. C. e Hall, J. E. (2006). *Textbook of Medical Physiology*. 11ª Edição. Filadélfia, Saunders-Elsevier Ltda.

Guzman T.J., Martínez-Ayala A. L. , García-López P. M., Soto-Luna I. C. , Gurrola-Díaz C.M. (2021): Effect of the acute and chronic administration of *Lupinus albus* B-conglutin on glycaemia, circulating cholesterol, and genes potentially involved (Biomedicine and Pharmacotherapy-Elsevier)

Halliwell, B. (2002). Effect of diet on cancer development: Is oxidative DNA damage a biomarker. *Free Radic. Biol. Med.*, 32, 968–974.

Havensteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 96, pp. 67 – 202.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584

.

Hoessli, D.C., Ahmas, I. (2008). Mistletoe lectins: carbohydrate-specific apoptosis inducers and immunomodulators, *Curr, Org. Chem.*, 12, 918-925.

Johnston, K.; Sharp, P.; Clifford, M.; Morgan, L. (2005). Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett.*, 579, 1653–1657.

Kaneto H. (2005). The JNK pathway as a therapeutic target for diabetes. *Expert Opin Ther Targets.* 9(3):581–592.

Kappel, V. D. *et al.* (2013). Beneficial effects of banana leaves (*Musa x paradisiaca*) on glucose homeostasis: multiple sites of action. *Revista de Farmacologia*, v. 23, n. 04, 2013.

Kishimoto, S.; Sato, M.; Tsunematsu, Y.; Watanabe, K. (2016). Evaluation of Biosynthetic Pathway and Engineered Biosynthesis of Alkaloids. *Molecules*, 21, 1078.

Kumar, Kk., Reddy, Gs., Reddy, B., Shekar, Pc., Sumanthi, J., & Chandra, Kl. P. (2012). Biological role of lectins: A review. *Journal of Orofacial Sciences*, 4(1), 20. <https://doi.org/10.4103/0975-8844.99883>

Knight, K. (2005). A systematic review of diabetes disease management programs. *Am. J. Manag. Care*, 11, 242–250.

Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A. M., & Vazquez-Moreno, L. (2017). Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>

Lake BG. (1999). Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 423-453.

Lam, S. K., & Ng, T. B. (2011). Lectins: Production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(1), 45–55. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2892-9>

Lammi, C. Zanoni, A. Arnoldi, G. Vistoli (2016), Peptides derived from soy and lupin protein as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors: in vitro biochemical screening and in silico molecular modeling study, *J. Agric. Food Chem.* 64 9601–9606, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04041>

Lammi, C. Bollati, S. Ferruzza, G. Ranaldi, Y. Sambuy, A. Arnoldi, (2018). Soybean- and lupin-derived peptides inhibit DPP-IV activity on in situ human intestinal Caco-2 cells and ex vivo human serum, *Nutrients* 10 11, <https://doi.org/10.3390/nu10081082>

Lau, Y.S.; Tian, X.Y.; Mustafa, M.R.; Murugan, D, (2013). Boldine improves endothelial function in diabetic db/db mice through inhibition of angiotensin II-mediated BMP4oxidative stress cascade. *Br. J. Pharmacol.*, 170, 1190–1198.

Lea, A.J.; Tung, J.; Zhou, X. A (2015). Flexible, Efficient Binomial Mixed Model for Identifying Differential DNA Methylation in Bisulfite Sequencing Data. *PLoS Genet.*, 11, e1005650.

Lin, D.R.; Hu, L.J.; You, H.; Sarkar, D.; Xing, B.S.; Shetty, K, (2016) Initial screening studies on potential of high phenolic-linked plantclonal systems for nitrate removal in cold latitudes. *J. Soils Sediment.*, 10, 923–932.

Li, WW.,You, J.J., Xu, H.L., Bao, J.K, (2011). Concanavalin A: A potential anti-neoplasticagent targeting apoptosis, autophagy and anti-nangiogenesis for cancer therapeutics. *Biochemical and Biophysical research Communications.*, 414, 282-286.

Lis, H. e Sharon, N., (1986). Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 35-67

Lobsanov, Y. D., Gitt, M. A., Leffler, H., Barondes, S. H. e Rini, J. M., (1993). X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 268, 27034-27038.

Lopez, P.M.; Mora, P.G.; Wysocka, W.; Maiztegui, B.; Alzugaray, M.E.; Zoto, H.D.; Borelli, M.I. (2004). Quinolizidine alkaloids isolated from *Lupinus* species enhance insulin secretion. *Eur. J. Pharmacol.*, 504, 139–142.

Loria P, Lonardo A, Anania F. (2013). Liver and diabetes. A vicious circle. *Hepatol Res.* 43(1):51–64.

Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., & Wyns, L. (1998). Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta -Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1383(1), 9–36. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(97\)00182-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(97)00182-9)

Luo, Y., Xu, X., Liu, J., LI, J., Su, Y., Liu, Z., Liu, J., Van Damme, E., Balzarini, J., Bao, J.,(2007).A novel mannose-binding tuber lectin from *Typhonium divaricatum* (L.) Decne (family *Araceae*) with antiviral activity against HSV-II and anti-proliferative effect on human cancer cell lines. *Journal Biochemistry and Molecular Biology*. v. 40, p.358-367.

Majee, S. B., & Biswas, G. R. (2013). Exploring plant lectins in diagnosis , prophylaxis and therapy. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(47), 3444–3451. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5289>

Mattila, P, Hellstrom J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 152-160.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, C., (2000). The effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 52, pp. 673 – 751.

Monteiro, S., Carreira, A., Freitas, R., Pinheiro, M., Ferreira, R. (2015). A non toxic polypeptide oligomer with a Fungicide potency is Equal on greater than than of their Chemical counterparts. *PIOS one* 10(4).

Munoz E. B., Luna-Vital D. A., Fornasini M., Baldeón M. E., Gonzalez de Mejia Elvira (2018): Gama-Conglutin peptides from Andean Lupin legume (*Lupinus mutabilis* Sweet) enhanced uptake and reduced gluconeogenesis in vitro (*Journal of Functional Foods-Elsevier*).

Nunes, E.S.; Souza, M.A.A.; Vaz, A.F.M.; Santana, G.M.S.; Gomes, F.S.; Coelho, L.C.B.B.; Paiva, P.M.G.; Silva, R.M.L.; Lucca, R.A.S.; Oliva ,M.L.V.; Guarnieri, M.C.G.; Correia, M.T.S. (2015). Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, v. 159, p. 57–63.

Nelson, D. L. e Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5ª Edição. Nova York, W. H. Freeman and Company

Oliveira, J.E.P.; Milech, A. (2018) *Diabetes mellitus: clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar*. São Paulo: Atheneu.

Olson, A., L. (2012). Regulation of GLUT4 and Insulin-Dependent Glucose Flux. *ISRN Molecular Biology*, 2012, pp. 1-12.

Oyedemi, S.O.; Yakubu, M.T.; Afolayan, A.J.A. (2011) Antidiabetic activities of aqueous leaves extract of *Leonotis leonurus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acad. J.*, 5, 119–125

Oza, M.J.; Kulkarni, Y.A.(2016) Phytochemical and complication in type 2 Diabetes—An update. *Int. J. Pharm.Sci. Res.*, 7, 14–24.

Pan, G.Y.; Huang, Z.J.; Wang, G.J.; Fawcett, J.P.; Liu, X.D.; Zhao, X.C.; Sun, J.G.; Xie, Y.Y. (2003) The antihyperglycaemic activity of berberine arises from a decrease of glucose absorption. *Planta Med.*,69, 632–636.

Papadakis MA, McPhee SJ. (2013) *Current Medical Diagnosis & Treatment*. 52a edition. The McGraw-Hill Companies I, editor. United States; 1192-1207.

Patel, D., Kumar, R., Laloo, D. e Hemalatha, S., (2012). Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, pp. 239-250.

Patel, D.K., Kumar, R., Laloo, D., Hemalatha, S. (2012) Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects.

Patel, D.K., Kumar, R., Laloo, D., Hemalatha, S. (2012) An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. Índia: Banaras Hindu University,. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23569923>

Peterson, J., Lagiou, P., Samoli, E., Katsouyanni, K., Vecchia, C.L., Dwyer, J., Trichopoulos, D. (2003). Flavonoid intake and breast cancer risk: a case – control study in Greece. *British Journal of Cancer*, 89(7), pp 1255 – 1259.

Peterson J, Dwyer J. (1998). Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18(12): 1995-2018.

Quintas, A., Freire, A. e Halpenn, M., (2008). In: *Bioquímica: Organização molecular da vida*. Lisboa: Lidel Edições, pp. 433-445.

Randhir, R.; Lin, Y.T.; Shetty, K. (2004) Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochem.*, 39, 637–646.

Rang, H., Dale, M., Ritter, J. e Flower, R., (2008). *Rang and Dale's Pharmacology*. 6º ed. s.l.:Elsevier Editora

Regente, M., Taveira, G. B., Pinedo, M., Elizalde, M. M., Ticchi, A. J., Diz, M. S. S., ... Gomes, V. M. (2014). A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications. *Current Microbiology*, 69(1), 88–95

Ribeiro, Ana Cristina Ferreira da Conceição, 1959-. (2008). Análise molecular de lectinas em sementes de leguminosas. FFUL. Retrieved from <http://repositorio.ul.pt/handle/10451/257>

Rizvi, S. e Mishra, N., (2013). Traditional Indian Medicines Used for the Management of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research*.

Robles-Sanchez, M.; Astiazaran-García, H.; Alvarez-Parrilla, E.; González-Aguilar, G.A. (2014). Phenolic compounds: Their journey after intake. *Food Funct.*, 5, 189–197

Rüdiger, H., Gabius, H. (2001). Review. Plant Lectins: Occurrence, biochemistry, function and applications. *Glycoconjugate Journal*, 18: 589-613.

Salas, P.M., Céliz, G., Geronazzo, H., Daz, M., Resnik, S.L. (2011). Antifungal activity and enzymatically – modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*, 124, pp. 1411 – 1415.

Sales, P.M.; Souza, P.M.; Simeoni, L.A.; Magalhães, P.O.; Silveira, D. (2012)  $\alpha$ -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 15, 141–183

Sandhar, H.K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., Sharma, P. (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), pp. 25 – 41.

Seifert, G., Jesse, P., Laengler, A., Reindl, T., Luth, M., Lobitz, S. (2008) Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro. *Cancer Lett.*, 264-218-28.

Sharon, N.; Lis, H. (1990) Legume lectins – a large family of homologous proteins. *FASEB Journal*, v. 4, p. 3198-3208,.

Simonson, D.C.; Ferrannini, E.; Bevilacqua, S.; Smith, D.; Barrett, E.; Carlson, R.; DeFronzo, R. (1984) Mechanism of improvement in glucose metabolism after chronic glyburide therapy. *Diabetes*, 33, 838–845

Solinas G, Becattini B. (2017). JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. *Mol Metab.* 6(2):174–184.

Solinas G, Karin M. (2010). JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *Faseb J.* 24(8):2596–2611.

Szkudelski, T.; Szkudelska, K. (2011) Anti-diabetic effects of resveratrol. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1215, 34–39.

Tapas, A.R., Sakarkar, D.M., Kakde, R.B. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (3), pp. 1089 – 1099.

Tarantino G, Caputi A. (2011). JNKs, insulin resistance and inflammation: a possible link between NAFLD and coronary artery disease. *World J. Gastroenterol.* 17(33):3785–3794

Tiong, S.H.; Looi, C.Y.; Hazni, H.; Arya, A.; Paydar, M.; Wong, W.F.; Cheah, S.-C.C.; Mustafa, M.R.; Awang, K. (2013) Antidiabetic and antioxidant properties of alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Molecules*, 18, 9770–9784.

Twardziok, M., Kleinsimon, S., Rolff, J., Jäger, S., Eggert, A., Seifert, G., & Delebinski, C. I. (2016). Multiple Active Compounds from *Viscum album* L. Synergistically Converge to Promote Apoptosis in Ewing Sarcoma. *PloS One*, 11(9), e0159749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159749>

Valadez-Vega, C., Alvarez-Manilla, G., Rivern-Negrete, L., Garcia-Carranc, A., Morales-Gonzalez, J. A., Zuniga-Perez, C., Morales-Gonzalez, Angel. (2011). Detection of cytotoxic activity of lectin on human colon adenocarcinoma (Sw480) and epithelialcervical carcinoma (C33-A). *Molecules*, 16(3), 2107–2118. <https://doi.org/10.3390/molecules16032107>

Valle, I. F. A. Análise do efeito dos flavonóides na resposta glicêmica e insulinêmica: uma revisão de literatura. Brasília, (2016), 37- Faculdade de Ciências da Saúde. Departamento de Nutrição.

Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Barre, A., & Rougé, P. (1998). Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(6), 575–692. [https://doi.org/10.1016/S0735-2689\(98\)00365-7](https://doi.org/10.1016/S0735-2689(98)00365-7)

Van Damme, J. M., Peumans, W. J., (1990). Developmental changes in the tissues distribution of lectin in *Galanthus nivalis* L. and *Narcissus* cv. Calton. *Planta*, 182, 605-609

Van Damme, E. J. M., Lannoo, N., & Peumans, W. J. (2008). Chapter 3 Plant Lectins. *Advances in Botanical Research*, 48(8), 107–209. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00403-5)

Van Damme, E. J. M., Lannoo, N., & Peumans, W. J. (2008). Chapter 3 Plant Lectins. *Advances in Botanical Research*, 48(8), 107–209. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00403-5)

Vega, N., Perez, G. (2006). Isolation and characterization of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochemistry*, V.67, 347-355.

Velderrain-Rodríguez, G.R (2014).; Palafox-Carlos, H.; Wall-Medrano, A.; AyalaZavala, J.F.; Chen, C.-Y.O.;

Vinayagam, R.; CHU, B. (2015). Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular

mechanism review. *Revista Nutrition & Metabolism*, v. 12, n. 60, p. 01-20.

Walker, J. M. (2014). *Lectins Methods and Protocol*. (J. Hirabayashi, Ed.). Humana Press.

WHO (2019), *Classification of diabetes mellitus*. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Wiedemann, M.; Gurrola-Díaz, C.; Vargas-Guerrero, B.; Wink, M.; García-López, P.; Düfer, M. (2015). Lupanine improves glucose homeostasis by influencing KATP channels and insulin gene expression. *Molecules*, 20, 19085–19100.

Wiseman H. (2013). *Phytochemicals: Health Effects*. In: Caballero B, Allen L, Prentice A (Ed.). *Encyclopedia of Human Nutrition. Third Edition*. Elsevier, pp. 1396-1400

Williamson, G. (2013) Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 57, n. 13, p. 48–57.

Yáñez, J. ,Vicente V, Alcaraz M, Castillo J, Benavente-García O, Canteras M, Teruel J.A, (2004). Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutrition and Cancer*, 49(2): 191-199.

Yau, T., Dan, X., Ng, C. C. W., & Ng, T. B. (2015) Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules*, 20(3), 3791–3810.

<https://doi.org/10.3390/molecules20033791>

Yazaki K, Sasaki K, Tsurumaru Y. (2009). Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry*, 70 (15-16): 1739-1745.

Zepeda P. A. C. , Gurrola-Diaz C. M. , Dominguez-R. J.A. , Garcia L. P. M., Andrade J.C.P., Hernandez N. Z. H. and Guerrero B. V, (2021). Effect of Lupinus rotundiflorus gamma conglutin treatment on JNK1 gene expression and protein activation in a rat model of type 2 diabetes.

Zhang Y, Seeram NP, Lee R, Feng L, Heber D. (2008). Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 670-675.

Webgrafia:

[https://www.uc.pt/ffuc/patrimonio\\_historico\\_farmaceutico/publicacoes/catalogosdeexposicoes/catalogo\\_1exp.pdf](https://www.uc.pt/ffuc/patrimonio_historico_farmaceutico/publicacoes/catalogosdeexposicoes/catalogo_1exp.pdf)

