

**HEMAGLUTININA DE FOLHAS DE  
MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz):  
PURIFICAÇÃO PARCIAL E TOXICIDADE**

**CHRYSYTIAN ARAUJO PEREIRA**

**2007**

**CHRYSYTIAN ARAUJO PEREIRA**

**HEMAGLUTININA DE FOLHAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*  
Crantz): PURIFICAÇÃO PARCIAL E TOXICIDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Pereira, Chrystian Araújo

Hemaglutinina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz):  
purificação parcial e toxicidade / Chrystian Araújo Araújo. -- Lavras :  
UFLA, 2007.

43 p. : il.

Orientadora: Angelita Duarte Corrêa.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Folha de mandioca. 2. Hemaglutinina. 3. Purificação. 4. Toxicidade.  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-615.9  
-630.24

**CHRYSYTIAN ARAUJO PEREIRA**

**HEMAGLUTININA DE FOLHAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*  
Crantz): PURIFICAÇÃO PARCIAL E TOXICIDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 1º de março de 2007.

Prof. Dr. José Donizeti Alves

UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA

Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus,  
por me dar a força para não desanimar  
durante os momentos mais difíceis.

Aos meus pais, José Carlos e Elizabeth,  
pelo apoio incondicional,  
pelo exemplo de dignidade e honestidade,  
pelo amparo em momentos de aflição  
e por tanto amor e carinho incessantes.

Aos meus irmãos Carlos Filipe e Lucas,  
por nossa união, nossa amizade e companheirismo.

Aos meus sogros Vicente e Mariana,  
por me receberem como filho.

E à minha esposa, companheira e amiga Luciana,  
pela paciência, compreensão e conforto nos momentos de angústia e incerteza.  
Por não deixar de acreditar nunca que esse momento seria possível  
e principalmente, pelo seu imenso e puro amor.

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela força e amparo.

À minha família e minha esposa, pelo apoio e amor incondicionais.

À professora Angelita Duarte Corrêa, pela orientação, ensinamentos, dedicação, atenção, apoio, carinho e amizade.

Ao professor Custódio Donizete dos Santos, pelas diversas contribuições, orientações e ensinamentos inestimáveis.

Ao professor Raimundo Vicente de Sousa, pela constante presteza, disposição, atenção e orientação, além de disponibilizar toda a estrutura do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia (DMV/UFLA) para os ensaios de toxicidade.

Ao professor José Donizeti Alves, pela gentileza em colocar à disposição o Laboratório de Biologia Molecular (Setor de Fisiologia Vegetal-DBI/UFLA) para a realização das análises.

À professora Celeste Maria Patto de Abreu, pelas contribuições e cordialidade, além da atenção como coordenadora da pós-graduação.

Ao Dr. Marcelo Murad Magalhães, pela receptividade, atenção, ensinamentos, presteza e auxílio na realização de parte fundamental deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Química, em especial à Miriam, pela gentileza e disposição constantes e à Maria Aparecida (Xulita), pela amizade, presteza e colaboração em todos os momentos.

Ao funcionário do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia (DMV), William César Cortez pela valiosa colaboração e receptividade na realização dos ensaios biológicos.

Aos alunos, Flávia Cristina Almeida Marcos e Luís Antônio Jária Barbosa, bolsistas de iniciação científica, pelo auxílio em várias etapas deste trabalho.

A todos os colegas de pós-graduação, em especial ao Luiz Gustavo e ao Guilherme pela amizade, companheirismo e ensinamentos.

Ao Departamento de Química e à UFLA pela oportunidade, e à CAPES, pelo apoio financeiro.

E a todos que, de alguma forma participaram e contribuíram para a conclusão deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO**

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE SIGLAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Aspectos gerais da cultura de mandioca.....	3
2.2 Composição química das folhas de mandioca.....	4
2.3 Hemaglutininas.....	5
2.3.1 Propriedades gerais.....	5
2.3.2 Distribuição.....	6
2.3.3 Características dos sítios de ligação.....	7
2.3.4 Classificação das lectinas de plantas.....	8
2.3.5 Funções fisiológicas no vegetal.....	11
2.3.6 Efeitos tóxicos decorrentes da ingestão.....	13
2.3.7 Aplicações práticas e atividades biológicas.....	15
2.3.8 Hemaglutininas em folhas de mandioca.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Colheita, secagem das folhas de mandioca e preparo da farinha de folhas de mandioca.....	17
3.2 Determinação de umidade.....	17
3.3 Extração das proteínas.....	18
3.4 Precipitação das proteínas e diálise.....	18
3.5 pH na precipitação das proteínas com sulfato de amônio.....	19
3.6 Liofilização.....	19
3.7 Purificação das proteínas.....	20
3.8 Atividade hemaglutinante.....	20
3.9 Determinação de proteínas.....	21
3.10 Avaliação da toxicidade.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Extração das proteínas.....	23



4.2 Precipitação das proteínas e diálise.....	24
4.2.1 Escolha do agente precipitante.....	24
4.2.2 Influência do pH durante a precipitação das proteínas com sulfato de amônio.....	27
4.3 Purificação das proteínas.....	28
4.4 Atividade hemaglutinante e dosagem de proteínas das frações purificadas .....	30
4.5 Recuperação de proteínas e atividade específica em vários estágios de purificação.....	31
4.6 Avaliação da toxicidade.....	32
5 CONCLUSÕES.....	34
6 PERSPECTIVAS.....	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

## **LISTA DE SIGLAS**

<b>MS</b>	Matéria seca
<b>FFM</b>	Farinha de folhas de mandioca
<b>UH</b>	Unidades hemaglutinantes

## LISTA DE TABELAS

		<b>Página</b>
TABELA 1	Famílias das lectinas de plantas: ocorrência e especificidade.....	12
TABELA 2	Teores de proteínas e atividade hemaglutinante de extratos protéicos obtidos da FFM.....	23
TABELA 3	Proteína e atividade hemaglutinante das frações precipitadas com sulfato de amônio.....	25
TABELA 4	Precipitação das proteínas do extrato bruto com sulfato de amônio a 80% de saturação e acetona 1:4 (extrato bruto:acetona).....	26
TABELA 5	Teores de proteínas e atividade hemaglutinante das frações purificadas.....	31
TABELA 6	Teores de proteínas e atividade específica em vários estágios de purificação das proteínas da farinha de folhas de mandioca.....	32

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
FIGURA 1 Classificação das lectinas quanto à estrutura dos sítios de ligação.....	9
FIGURA 2 Proteína e atividade hemaglutinante nos extratos brutos precipitados com sulfato de amônio a 80% de saturação.....	28
FIGURA 3 Perfil de separação das proteínas obtidas do extrato aquoso da farinha de folhas de mandioca.....	29

## RESUMO

PEREIRA, Chrystian Araújo. **Hemaglutinina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): purificação parcial e toxicidade**. 2007. 43p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

No intuito de reduzir os níveis de desnutrição no país, diversos setores da sociedade, como a Pastoral da Criança, vêm buscando alternativas para a suplementação alimentar de populações carentes, como por exemplo, o uso de uma multimistura. Um dos componentes dessa multimistura é a farinha de folhas de mandioca (FFM) que possui elevado conteúdo em proteínas, vitaminas e minerais. Todavia, as folhas de mandioca também apresentam algumas substâncias consideradas antinutritivas e ou tóxicas, como cianeto, polifenóis, nitrato, ácido oxálico, hemaglutinina, saponinas e inibidores de tripsina. Entre estas, destaca-se a hemaglutinina ou lectina, cujos estudos disponíveis até a presente data referem-se apenas à sua atividade hemaglutinante. O objetivo deste trabalho foi extrair as proteínas da FFM, purificando-as em coluna cromatográfica e determinar sua atividade hemaglutinante e toxicidade. Foram testadas várias estratégias de extração e precipitação das proteínas, tendo o maior teor protéico e atividade hemaglutinante sido obtidos na extração com água destilada na proporção 1:20 (p/v), seguida da precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação. As proteínas precipitadas foram purificadas em coluna Q-Sepharose Fast Flow. Das quatro frações obtidas na purificação (I, II, III e IV), a I e a II apresentaram maiores atividades específicas. As mesmas frações foram injetadas via intraperitoneal em camundongos com doses para cada animal com 20g de peso de 2µg (fração I), 3µg (fração II), 54µg (fração III) e 52µg (fração IV), não sendo observadas mortes ou quaisquer efeitos adversos, após 120 horas.

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Dra. Angelita Duarte Corrêa (Orientadora), Dra. Celeste Maria Patto de Abreu, Dr. Custódio Donizete dos Santos – DQI e Dr. Raimundo Vicente de Sousa – DMV (Co-orientadores) – UFLA.

## ABSTRACT

PEREIRA, Chrystian Araújo. **Hemagglutinin of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz): partial purification and toxicity**. 2007. 43p. Dissertation (Master in Agronomy, major Agrochemistry and Agrobiotechnology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

With the purpose of reducing the levels of undernutrition in the country, several sectors of society, such as the Child's Pastoral (Pastoral da Criança), has been seeking alternatives to the feed supplementation of low-income wanting populations, as for example, the use of a multimixture. One of the components of that multimixture is cassava leaf flour (FFM) which possesses a high content of proteins, vitamins and minerals. However, the cassava leaves also present some substance regarded as antinutritive and/or toxic, such as cyanide, polyphenols, nitrate, oxalic nitrate, hemagglutinin, saponins and trypsin inhibitors. Out of those, hemagglutinin or lectin stands out, the studies of which available up to the present date, are concerned with only its hemagglutinating activity. The objective of this work was to extract the proteins from FFM, purifying them in chromatographic column and determine their hemagglutinating activity and toxicity. A number of strategies of extraction and precipitation of proteins were tested; the highest protein content and hemagglutinating activity were obtained in the extraction with distilled water at the 1:20 ratio (p/v) followed of the precipitation with ammonium sulfate at 80% of saturation. The precipitated proteins were purified in Q-Sepharose Fast Flow column. Out of the four purification fractions (I, II, III e IV), the I and II activities presented higher specific activity. The same fractions were injected intraperitoneal via in mice with doses for each 20g animal of 2µg (fraction I), 3µg (fraction II), 54µg (fraction III) and 52µg (fraction IV), no deaths or any adverse effects being observed after 120h.

---

Guidance Committee: Dr. Angelita Duarte Corrêa (Adviser), Dr. Celeste Maria Patto de Abreu, Dr. Custódio Donizete dos Santos – DQI and Dr. Raimundo Vicente de Sousa – DMV (Co-advisers) – UFLA.

## 1 INTRODUÇÃO

A pesquisa da composição química dos diversos alimentos utilizados cotidianamente na dieta humana, associada à crescente busca por alternativas alimentares e nutricionais, devido à escassez alimentar, principalmente em países subdesenvolvidos, gera a necessidade de estudos sobre a relação consumo/benefício dos alimentos. Esses estudos buscam elucidar os fatores nutricionais e antinutricionais presentes nas fontes alimentares convencionais ou alternativas, além de determinar padrões de consumo seguro para o ser humano.

No Brasil, os elevados níveis de desnutrição e a escassez alimentar em determinadas regiões do país têm impulsionado a criação de programas sociais que combatam esses problemas com alternativas alimentares de elevado valor nutricional, baixo custo e fácil acesso.

No intuito de reduzir os níveis de desnutrição no país, diversos setores da sociedade, como a Pastoral da Criança, vêm buscando alternativas para a suplementação alimentar de populações carentes, como por exemplo, o uso de uma multimistura. Essa multimistura é constituída, principalmente, de alimentos não-convencionais e ou subprodutos agroindustriais ricos em diferentes nutrientes. Segundo Câmara & Madruga (2001), o seu uso como suplemento alimentar, em programas de intervenção nutricional para populações brasileiras carentes, vem se apresentando como uma alternativa alimentar de valor nutritivo razoável, baixo custo, preparo rápido e paladar regionalizado.

Um dos componentes dessa multimistura é a farinha de folhas de mandioca que possui elevado conteúdo em proteínas, vitaminas e minerais quando comparados a hortaliças folhosas convencionais. Todavia, elas também apresentam algumas substâncias consideradas antinutritivas e ou tóxicas, como cianeto, polifenóis, nitrato, ácido oxálico, hemaglutinina, saponinas e inibidores

de tripsina. Estas substâncias podem ocasionar malefícios à saúde, dependendo da quantidade consumida ou, então, podem trazer benefícios, dependendo da substância e ou da circunstância.

Entre as substâncias presentes nas folhas de mandioca, destaca-se a hemaglutinina, ou lectina, cujos estudos disponíveis, até a presente data, referem-se apenas à sua atividade hemaglutinante.

De modo geral, as lectinas acarretam efeitos degenerativos nas membranas celulares e podem inibir a ação de enzimas digestivas, interferindo na absorção dos nutrientes, causando diminuição do crescimento e até mesmo serem letais. Além disso, com o crescente interesse em pesquisas e aplicações práticas dessa classe de substâncias, tais como estudos em oncogênese, bioquímica e imunologia, ação inseticida e outras, torna-se necessária uma investigação mais detalhada desse antinutriente na folha de mandioca.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi extrair, purificar e avaliar a toxicidade da hemaglutinina da folha de mandioca.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais da cultura de mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta perene, arbustiva, pertencente à família das Euforbiáceas, largamente cultivada por índios na América do Sul e trópicos há mais de um século (Chew, 1972; Lorezi & Dias, 1993).

Constitui-se em uma cultura de climas áridos, possuindo habilidade de crescer em solos pobres e relativa resistência às ervas daninhas e aos insetos, características que a tornam um alimento importante em diversas regiões pobres do mundo (Paiva, 1994). É bem tolerante à seca e possui ampla adaptação às mais variadas condições de clima e solo. A longevidade das folhas varia de 60 a 120 dias e sua perda total ocorre naturalmente, caracterizando o período de repouso fisiológico. Esse período é o mais favorável para a colheita das raízes, devido à maior concentração de amido (Lorezi & Dias, 1993).

Com a expansão da cultura no país, surgiu uma série de limitações, como o curto tempo de conservação das raízes depois de colhidas, devido à rápida deterioração, interferindo na qualidade comercial. Dessa forma, diversos tratamentos adequados têm sido desenvolvidos para diminuir sua perecibilidade (Paiva, 1994).

Com uma produção acima de 170 milhões de toneladas de raízes, a mandioca constitui uma das principais explorações agrícolas do mundo. Entre as tuberosas, perde apenas para a batata. Nos trópicos, essa importância aumenta (EMBRAPA, 2005). Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial, com uma produção de 27,5 milhões de toneladas, em 2006 e estimativa semelhante para 2007, sendo os estados do Pará, Bahia, Paraná e Maranhão, os maiores produtores, responsáveis por 54,3% desse total (SECTEC, 2007).

Além do substancial consumo das raízes, tem sido proposta a utilização da parte aérea da planta, que até então é tratada como um subproduto agrícola, mas que, nutricionalmente, apresenta um grande potencial para consumo humano. Desta parte aérea, considera-se aproveitável, do ponto de vista nutricional, apenas o terço superior, representado pelas folhas (Carvalho & Kato, 1987).

De acordo com dados da FAO (2007), no Brasil, a área plantada com mandioca foi de, aproximadamente, 1,8 milhão de hectares, em 2004, equivalentes a 36 bilhões de plantas (densidade de plantio de 20.000 plantas/ha). Segundo Carvalho & Kato (1987), ao se considerar um peso médio de 0,45 kg de terço superior/planta, esta área plantada forneceria, aproximadamente, 14 milhões de toneladas de terço superior sem utilização prática.

## **2.2 Composição química das folhas de mandioca**

As folhas de mandioca são ricas em proteínas, vitaminas e minerais. Os teores de proteínas em folhas de mandioca variam de 20,77 a 37,94 g/100g de matéria seca (MS) (Corrêa et al., 2004; Madruga & Câmara, 2000; Melo, 2005; Modesto et al., 2001; Ortega-Flores et al., 2003; Wobeto et al., 2006).

Segundo Carvalho & Kato (1987), as proteínas das folhas da mandioca apresentam boa qualidade, ou seja, um bom perfil de aminoácidos, com deficiência apenas em alguns sulfurados, principalmente metionina e com teores elevados de lisina, que possibilitam a formulação de dietas nas quais a parte aérea entra como suplementadora de aminoácidos, visando à obtenção de melhor qualidade protéica. Já Ortega-Flores et al. (2003) relatam que as folhas de mandioca não são deficientes em nenhum dos aminoácidos essenciais.

Os teores de  $\beta$ -caroteno e de vitamina C da farinha de folhas de mandioca (FFM) variam de 14,09 a 137,38mg/100g MS e de 43,64 a 257,64mg/100g MS, respectivamente (Corrêa et al., 2004; Melo, 2005; Wobeto

et al., 2006). Já os níveis dos minerais Ca, Mg, Mn, Fe e Zn, variam de 0,98 a 2,21g/100g MS, de 160 a 350mg/100g MS, de 105,77 a 225,60mg/100g MS, de 50,30 a 333,69mg/kg MS e de 4,05 a 91,89mg/kg MS, respectivamente (Melo, 2005; Wobeto et al., 2006). A composição química da parte aérea da mandioca sofre variações acentuadas com a idade das plantas e depende também do grau de enfolhamento (Carvalho & Kato, 1987).

Contudo, as folhas de mandioca também apresentam, em sua constituição, substâncias antinutritivas e ou tóxicas que podem comprometer seu uso, dependendo das quantidades ingeridas e da forma de consumo. Foi relatada a presença de ácido oxálico, nitrato, cianeto, polifenóis, inibidores de tripsina, saponinas (Corrêa, 2000; Melo, 2005; Wobeto, 2003) e hemaglutininas (Melo, 2005; Wobeto, 2003).

Dentre essas substâncias antinutritivas, a hemaglutinina é pouco estudada. Os dados da literatura são relacionados apenas à sua atividade hemaglutinante (Melo, 2005; Wobeto, 2003) e, portanto, insuficientes para estabelecer os parâmetros de consumo seguro da FFM.

## **2.3 Hemaglutininas**

### **2.3.1 Propriedades gerais**

Hemaglutininas, também denominadas lectinas, são glicoproteínas que têm a propriedade específica de se ligar a certos carboidratos. Apresentam em geral, massa molar entre 80.000 e 130.000g/mol e o teor de açúcar em suas moléculas está entre 5% e 13%, além de toxicidade e resistência térmica variáveis (Sgarbieri, 1987).

Devido a esta propriedade de ligação a carboidratos, as hemaglutininas podem ligar-se a certos componentes da membrana das células sanguíneas. São conhecidas por sua habilidade em aglutinar células, especialmente células

vermelhas sangüíneas chamadas de eritrócitos, provocando o fenômeno da hemaglutinação (Reynoso-Camacho et al., 2003).

A primeira descrição de uma hemaglutinina de planta foi feita por Stillmark, em 1889, que isolou, a partir de *Ricinus communis*, uma proteína tóxica, denominada ricina, com capacidade de aglutinar eritrócitos de humanos e animais (Liener, 1980; Sharon & Lis, 2004).

Em 1954, Boyd & Shapleigh propuseram o termo “lectina”, do latim *legere* = escolher, para denotar a habilidade de ligar-se especificamente a células vermelhas do sistema ABO de grupos sangüíneos (Vasconcelos & Oliveira, 2004). O termo lectina foi generalizado para englobar todas aglutininas açúcar-específicas de origem não-imune, independente da fonte e especificidade de tipo sangüíneo (Sharon & Lis, 2004).

Atualmente, sabe-se que as lectinas são muito difundidas na natureza, e extratos de, aproximadamente, 800 espécies vegetais apresentam atividade aglutinante (Shibamoto & Bjeldanes, 1996).

Uma das mais importantes características das lectinas, compatível com a proposta função de defesa, é a elevada resistência à proteólise e à variação de pH, mesmo quando ela se encontra fora do seu ambiente natural (Peumans & Van Damme, 1995; Vasconcelos & Oliveira, 2004).

Outras duas características das lectinas, descobertas na década de 1960, são a estimulação da mitogênese de linfócitos e a aglutinação de células tumorais, de grande importância nos campos da imunologia e da medicina (Sharon & Lis, 2004).

### **2.3.2 Distribuição**

As lectinas são encontradas em muitos organismos, desde vírus e bactérias, até animais e plantas (Lis & Sharon, 1998). Em plantas superiores, a maioria é encontrada em sementes, mas tubérculos e seivas também são fontes.

Em alguns casos, sua presença em folhas, caules e cascas também foi demonstrada (Liener, 1980).

As lectinas são encontradas, principalmente, nas famílias Fabaceae, Gramineae, Algae, Euphorbiaceae e outras, sendo a primeira a que apresenta o maior número de lectinas isoladas, principalmente em sementes (Loris et al., 1998; Sharon, 1993). Estão presentes em feijão, ervilha, soja, amendoim, germe de trigo, arroz, milho, orégano, repolho, alho, tomate, cogumelo, batata, cenoura, cereja, amora, abacate e outros, como também em várias espécies não cultivadas. No entanto, existem relatos de intoxicação em humanos apenas com lectinas de feijão, devido ao pouco tempo de cozimento (Vasconcelos & Oliveira, 2004).

### **2.3.3 Características dos sítios de ligação**

Lectinas são proteínas com, no mínimo, um domínio não catalítico que liga-se reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos (Peumans & Van Damme, 1998). Esta interação é mediada por pontes de hidrogênio ou forças de van der Waals (Weis & Drickamer, 1996).

A ligação a mono ou oligossacarídeos é específica, no entanto, as lectinas - à exceção das quimerolectinas - são desprovidas de atividade catalítica e, ao contrário dos anticorpos, não são produtos de uma resposta imune. Cada molécula de lectina contém, tipicamente, dois ou mais sítios de ligação a carboidratos - são di ou polivalentes. Portanto, quando elas reagem com células, por exemplo, eritrócitos, elas não combinarão apenas com açúcares na sua superfície, mas também causarão uma ligação cruzada das células e sua subsequente precipitação, um fenômeno referido como aglutinação das células. A aglutinação de eritrócitos (hemácias), ou a atividade hemaglutinante das lectinas, é o principal atributo dessas proteínas e é usada rotineiramente, para a sua detecção e caracterização (Lis & Sharon, 1998).

As lectinas de plantas reconhecem apenas um restrito grupo de açúcares, que inclui os monossacarídeos: D-glicose, D-galactose, D-manose, L-fucose (6-desoxi-L-galactose), dois amino-açúcares: N-acetil-D-glucosamina e N-acetil-D-galactosamina e os ceto-açúcares: D-frutose e L-sorbose. A maioria reconhece e interage com extremidades não-redutoras de oligo e polissacarídeos e polímeros complexos, tais como, glicoproteínas e glicolípides (Goldstein, 2002).

A especificidade das lectinas é, usualmente, determinada por ensaios de inibição da aglutinação das células ou da precipitação de glicoproteínas, nos quais diferentes carboidratos são utilizados para verificar a sua capacidade de inibir a atividade da lectina (Sharon & Lis, 1990).

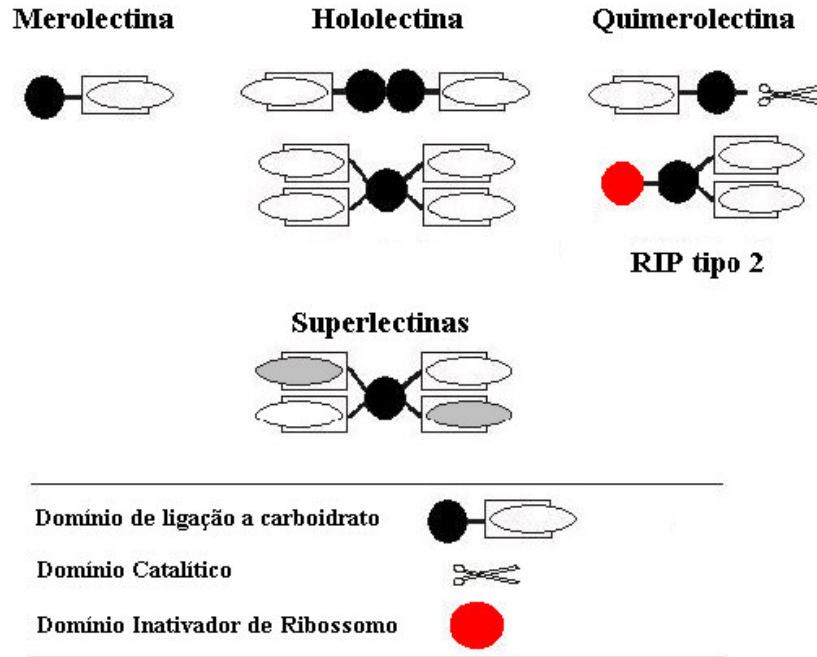
Além da especificidade ao sítio de ligação, a maioria das lectinas de legumes apresenta, como propriedade físico-química geral, a necessidade de um íon metálico como  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  (ou outro metal de transição), para sua ligação (Liener, 1980; Sharon & Lis, 1990; Van Damme et al., 1998).

#### **2.3.4 Classificação das lectinas de plantas**

As lectinas representam um grupo heterogêneo de proteínas oligoméricas que variam bastante no tamanho, na estrutura, na organização molecular, bem como na constituição de seus sítios de ligação. Apesar de muitas delas possuírem características estruturais e seqüências similares, pertencem a famílias de proteínas diferentes. Contudo, a similaridade com seqüências de lectinas conhecidas é uma importante característica para detecção e identificação de novas lectinas (Lis & Sharon, 1998).

Considerando: (1) a definição de lectinas como proteínas que possuem pelo menos um domínio não-catalítico e que se ligam de forma reversível e específica a mono ou oligossacarídeos, (2) suas propriedades de precipitação e ou aglutinação de glicoconjugados e, (3) especialmente, sua estrutura, as lectinas são classificadas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas

(Peumans & Van Damme, 1995; Van Damme et al., 1998), as quais estão ilustradas na Figura 1.



**FIGURA 1** Classificação das lectinas quanto à estrutura dos sítios de ligação (Van Damme et al., 1998 adaptado por Boleti, 2003).

### a) Classificação quanto aos sítios de ligação

#### **Merolectinas**

As merolectinas são proteínas constituídas, exclusivamente, de apenas um domínio de ligação a carboidratos. Por serem pequenas, devido à sua natureza monovalente, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Um exemplo deste grupo é a heveína, extraída do látex de *Hevea*

*brasiliensis* (Van Parijs et al., 1991) e proteínas manose-específicas de orquídeas (Peumans & Van Damme, 1995).

### **Hololectinas**

As hololectinas também são constituídas exclusivamente de domínios de ligação a carboidratos, no entanto, contêm dois ou mais domínios, que são idênticos ou muito homólogos. Compreendem todas lectinas que tem múltiplos sítios de ligação e, portanto, são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. A maioria de todas lectinas de plantas conhecidas é hololectina, porque se comportam como hemaglutininas (Peumans & Van Damme, 1995).

### **Quimerolectinas**

As quimerolectinas correspondem à fusão de proteínas que possuem um domínio de ligação a carboidrato e um outro domínio não relacionado, que possui uma atividade catalítica bem definida (ou outra atividade biológica) e que atua independentemente do primeiro. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, quimerolectinas comportam-se como merolectinas ou hololectinas. Como exemplo, cita-se a ricina (lectina da mamona), pertencente à família das proteínas inativadoras de ribossomos (RIP tipo 2), que possui dois sítios de ligação a carboidratos (Peumans & Van Damme, 1995).

### **Superlectinas**

Apresentam, no mínimo, dois sítios de ligação a carboidratos, que diferem dos sítios das hololectinas por reconhecerem açúcares estruturalmente e funcionalmente diferentes. A lectina do bulbo de tulipa possui dois domínios de ligação a carboidrato que reconhecem manose e N-acetil-galactosamina, respectivamente (Van Damme et al., 1998).



## **b) Grupos ou famílias de lectinas**

Lectinas de plantas são, usualmente, consideradas como um grupo muito heterogêneo de proteínas porque estudos bioquímicos comparativos indicam que elas diferem umas das outras com relação às suas propriedades bioquímicas/físico-químicas, estrutura molecular, especificidade de ligação a carboidratos e atividades biológicas. Contudo, devido ao rápido progresso na análise estrutural de lectinas, clonagem molecular de seus genes e a análise das seqüências disponíveis, foi possível distinguir sete famílias de proteínas relacionadas evolutivamente (Van Damme et al., 1998).

Esta classificação baseada nas semelhanças estruturais e evolutivas das lectinas define sete grupos ou famílias: lectinas de legumes, lectinas de monocotiledôneas, lectinas ligantes a quitina, proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2 (RIP), floema de Cucurbitaceae, família Jacalina e Amaranthaceae (Peumans & Van Damme, 1998). Na Tabela 1 está apresentada a classificação das lectinas em famílias.

As quatro primeiras famílias apresentadas na Tabela 1 possuem numerosos membros, enquanto as três últimas são consideradas pequenas famílias de proteínas. A maioria das lectinas de plantas conhecidas pode ser classificada em uma dessas sete famílias. Algumas lectinas, entretanto, não se encaixam no sistema de classificação ou não podem ser classificadas, porque não existem informações disponíveis sobre suas seqüências (Van Damme et al., 1998).

### **2.3.5 Funções fisiológicas no vegetal**

Várias hipóteses foram propostas para as funções das lectinas nos organismos vegetais, das quais destacam-se: atuação como anticorpos que neutralizam bactérias do solo, proteção da planta contra ataque de fungos, ligação a enzimas glicoprotéicas em sistemas multienzimáticos organizados,

participação no desenvolvimento e diferenciação de células embrionárias e transporte ou armazenamento de açúcares (Liener, 1980).

**TABELA 1** Famílias das lectinas de plantas: ocorrência e especificidade.

Famílias de lectinas	Ocorrência		Especificidade
	Distribuição taxonômica	Lectinas identificadas	
Legume	Legumes	>100	Diversa
Monocotiledôneas	Liliales	>50	Manose
Ligantes a quitina	Mono ou Dicotiledôneas	>100	GlcNac ou (GlcNac) <sub>n</sub>
Tipo 2 RIP	Mono ou Dicotiledôneas	>20	Gal, GalNac ou NeuAc α(2,6)-Gal/GalNac
Floema de Cucurbitaceae	Cucurbitaceae	<10	(GlcNac) <sub>n</sub>
Família Jacalina	Moraceae Convolvulaceae	<10	Gal Manose/Maltose
Amaranthaceae	Amaranthaceae	<10	GalNac

Gal – galactose

GalNac – N-acetilgalactosamina

GlcNac – N-acetilglicosamina

NeuAc – ácido neuramínico

**Fonte:** Peumans & Van Damme (1998) adaptado por Boleti (2003).

Argumentos moleculares, bioquímicos, celulares, fisiológicos e evolucionários indicam que as lectinas têm uma função na defesa das plantas, fundamentada na observação de que lectinas de plantas ligam-se a glicoconjugados de outros organismos (Van Damme et al., 1998).

Duas hipóteses sobre as funções das lectinas, levantadas na década de 1970 ainda são discutidas. A primeira sugere que as lectinas protegem as plantas contra microrganismos fitopatogênicos e insetos, bem como contra animais predadores. Já a segunda teoria assume que elas estão envolvidas na associação entre leguminosas e suas bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio (Sharon & Lis, 2004).

Sua função de defesa contra uma grande variedade de insetos é importante pelo seu potencial uso como inseticida de ocorrência natural (Pusztai & Bardocz, 1996; Vasconcelos & Oliveira, 2004).

Nos últimos anos, evidências acumularam-se para suportar a idéia de que, quando as plantas são submetidas a estímulos bióticos ou abióticos, elas respondem por meio da expressão de lectinas citoplasmáticas e ou nucleares. A localização e a regulação da expressão dessas lectinas indicam que elas estão envolvidas em interações proteína-carboidrato endógenas específicas. Esses novos achados sugerem que as lectinas podem estar envolvidas na sinalização e na regulação celular (Van Damme et al., 2004).

### **2.3.6 Efeitos tóxicos decorrentes da ingestão**

Como as lectinas não são degradadas durante sua passagem pelo trato digestivo, elas podem reconhecer resíduos de carboidratos presentes nas células intestinais, ligando-se aos mesmos (Vasconcelos & Oliveira, 2004). Essa ligação às células das microvilosidades intestinais provoca interferência na absorção e utilização de nutrientes (Sgarbieri, 1987).

Pusztai et al. (1998), trabalhando com lectina isolada de *Viscum album*, observaram crescimento hiperplásico dose-dependente do intestino delgado de ratos.

Além dos efeitos degenerativos nas membranas celulares, as lectinas mostraram a capacidade de inibir várias enzimas intestinais (Vasconcelos &

Oliveira, 2004). Devido à sua interferência na absorção de nutrientes, podem reduzir o crescimento e, dependendo da dose, podem ser letais (Santoro et al., 1997).

Efeitos deletérios sistêmicos em vários órgãos e tecidos também podem ocorrer a partir da absorção intestinal, por endocitose e posterior exocitose de lectinas, com liberação na circulação sistêmica (Pusztai & Bardocz, 1996; Vasconcelos & Oliveira, 2004).

Bardocz et al. (1996) relataram depressão do crescimento, redução do peso corporal, diminuição de musculatura esquelética, aumento do catabolismo de lípidos, além de redução significativa dos níveis de insulina sanguínea e pancreática em ratos (peso corporal de 80g aproximadamente) expostos, durante 10 dias por via oral, a doses de até 450mg/kg de peso corporal, da lectina de *Phaseolus vulgaris*.

Lectina extraída de *Phaseolus acutifolius*, administrada em grupos de oito camundongos com peso médio de 20g via injeção intraperitoneal, provocou perda de peso corporal de maneira dose-dependente e alterações no intestino delgado, baço e timo, após 15 dias da administração. Apesar disso, a DL<sub>50</sub> de 22.000µg/20g de peso do animal revelou baixa toxicidade aguda (Reynoso-Camacho et al., 2003).

Antunes et al. (1995) observaram elevada toxicidade aguda de quatro cultivares de feijão *Phaseolus vulgaris*. Todos os ratos alimentados com dieta contendo feijão cru morreram num intervalo de 2 a 9 dias. Os autores sugerem que a elevada letalidade pode ter sido provocada por diversos fatores antinutricionais do feijão, mas destacam a presença de inibidores de tripsina e lectinas.

As lectinas podem afetar significativamente todo o trato digestivo e sua flora bacteriana, alterando o metabolismo corpóreo normal. São poderosos agentes imunogênicos via oral e parenteral e alguns de seus efeitos fisiológicos

estão intrinsecamente relacionados à sua interferência no sistema imunológico (Pusztai & Bardocz, 1996).

### **2.3.7 Aplicações práticas e atividades biológicas**

Apesar dos potenciais efeitos deletérios, as lectinas apresentam grande utilidade no campo da pesquisa científica, devido às suas características de: (1) ligação a açúcares específicos, sendo empregada nos estudos de tipos sanguíneos, (2) estimulação da mitogênese de linfócitos, abrindo novas perspectivas no campo da imunologia e (3) aglutinação de células cancerígenas, sendo utilizadas nos estudos de oncogênese (Sharon & Lis, 2004).

As lectinas apresentam uma variedade de atividades biológicas, incluindo antitumorais (Abdullaev & De Mejia, 1997; Feng et al., 2006; Kaur et al., 2005), imunomodulatórias (Feng et al., 2006; Kaur et al., 2005; Peumans et al., 2000; Wong & Ng, 2006), anti-HIV (Balzarini et al., 2004; Barrientos & Gronenborn, 2005; Wang & Ng, 2001; Wong & Ng, 2006), antifúngicas (Brokaert et al., 1989; Schlumbaum et al., 1986; Van Parijs et al., 1992) e inseticidas (Macedo et al., 2003; Murdock et al., 1990; Vasconcelos & Oliveira, 2004).

Adicionalmente, as lectinas são usadas na separação e identificação de células, detecção, isolamento e estudos estruturais de glicoproteínas, investigação de carboidratos em células e organelas subcelulares (histoquímica e citoquímica), mapeamento de vias neuronais e estudos de biossíntese de glicoproteínas, entre outros (Sharon & Lis, 2004).

As lectinas podem ligar-se a receptores glicoprotéicos do trato digestivo de insetos e provocar efeitos deletérios locais ou sistêmicos que podem repelir ou retardar o crescimento ou, até mesmo, matar o inseto (Peumans et al., 2000). A característica biológica de atuar como um inseticida natural na defesa do vegetal é de grande potencial econômico, visto que os genes das lectinas são

bons candidatos a conferir resistência contra pragas em produtos agrícolas transgênicos (Cavada et al., 1998; Pusztai & Bardocz, 1996).

O uso de lectinas como bloqueadores de patógenos, estimulantes imunológicos, moduladores hormonais e agentes metabólicos para aplicações em clínica médica apresenta possibilidades promissoras (Pusztai & Bardocz, 1996).

As potenciais aplicações farmacológicas dessas proteínas têm estimulado a contínua investigação, isolamento e caracterização de novas lectinas (Ramos et al., 1998).

### **2.3.8 Hemaglutininas em folhas de mandioca**

Em trabalho realizado com farinha de folhas de mandioca (FFM) de diversas cultivares com diferentes idades da planta, foi observada redução da atividade hemaglutinante com o aumento da maturidade do vegetal (Wobeto, 2003). Neste trabalho, foi detectada hemaglutinação até a primeira diluição na base 2 ( $2^1$ ) do extrato da FFM, com sangue humano tipo A Rh positivo. A autora ressaltou que as espécies vegetais apresentam toxidez bastante variável e testes toxicológicos seriam recomendáveis. A atividade hemaglutinante também foi detectada até a segunda diluição na base 2 ( $2^2$ ) com sangue humano tipo A Rh positivo, do extrato da FFM de cultivar Cacao (Melo, 2005).

Portanto, constata-se que as informações disponíveis sobre as hemaglutininas em folhas de mandioca referem-se apenas à atividade hemaglutinante, não havendo relatos sobre purificação, caracterização ou potencial tóxico.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi conduzido nos Departamentos de Química (DQI), Biologia (DBI - Setor de Fisiologia Vegetal) e de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal de Lavras.

#### **3.1 Colheita, secagem das folhas de mandioca e preparo da farinha de folhas de mandioca**

Folhas maduras de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivar Cação, originárias da Fazenda Rio Grande, município de Lavras, MG, foram colhidas, aos 12 meses de idade da planta e transportadas para o Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras. As folhas foram lavadas em água corrente e água destilada, colocadas em bancada para escorrer e, em seguida, secas em estufa ventilada à temperatura de 30°C a 35°C. Os pecíolos foram retirados após 24 horas de secagem e permaneceram na estufa por mais 24 horas. Em seguida, as folhas foram passadas em moinho tipo Willy e a farinha obtida foi armazenada em geladeira, em frasco hermeticamente fechado.

#### **3.2 Determinação de umidade**

A dosagem de umidade foi feita em triplicatas, nas folhas frescas e na farinha de folhas de mandioca (FFM), segundo a metodologia da AOAC (2000), que consiste na perda de água por desidratação, em temperaturas de 100°C a 105°C.

### **3.3 Extração das proteínas**

Com o objetivo de obter melhor rendimento da extração das proteínas da FFM, foram testados dois extratores, água destilada e solução salina tamponada (NaCl 0,15 mol/L, pH 7,4 tampão fosfato) em três proporções: 1:10, 1:15 e 1:20 (p/v), sob agitação mecânica, por 3 horas, à temperatura ambiente. Depois, a suspensão foi filtrada em tecido de organza e centrifugada, a 15.000 x g, por 15 minutos, a 5°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante (extrato bruto) foi utilizado para a determinação de proteínas e medida da atividade hemaglutinante.

Escolhidas as melhores condições de extração protéica, adotou-se reextrair o resíduo da filtração obtido das extrações por três vezes sucessivas, em três repetições, nas mesmas condições, reunido-se os sobrenadantes com o objetivo de melhorar o rendimento da extração.

### **3.4 Precipitação das proteínas e diálise**

Foram testados dois agentes precipitantes: sulfato de amônio e acetona.

Ao extrato bruto adicionou-se sulfato de amônio sólido em pequenas quantidades até atingir percentuais de saturação de 25%, 50%, 80% e 90%. Para a saturação de 25%, adicionaram-se ao extrato bruto 14,4g de sulfato de amônio/100mL; para as de 50%, 80% e 90%, ao sobrenadante de cada precipitação anterior adicionaram-se 15,5g, 21,0g e 7,3g de sulfato de amônio/100mL, respectivamente (Moreira & Perrone, 1977). Durante a adição do sulfato de amônio, o extrato bruto foi mantido em recipiente com gelo, sob agitação magnética e acompanhamento da variação de pH (Cooper, 1942). Em seguida, a mistura foi colocada em repouso, em geladeira, durante 24 horas. Após esse período, a mistura foi centrifugada, a 1.800 x g, por 20 minutos, em temperatura ambiente. O precipitado obtido foi redissolvido em 2mL de salina tamponada e dialisado extensivamente contra água (membrana de celulose para



diálise 25mm, volumes de 2L de água, 3 trocas diárias, durante 72 horas, em geladeira e agitação magnética) para a retirada dos sais. Os precipitados obtidos foram, então, submetidos à dosagem de proteínas e ao ensaio de atividade hemaglutinante.

A precipitação das proteínas do extrato bruto com acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  foi feita na proporção 1:4 (extrato bruto:acetona), seguida de repouso em congelador da geladeira por 24 horas. Após, a mistura foi centrifugada a 1.800 x g, por 20 minutos, em temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado mantido em repouso em temperatura ambiente, para a evaporação da acetona residual. Em seguida, o precipitado foi ressuspense em 2mL de salina tamponada para dosagem de proteínas e medida da atividade hemaglutinante.

### **3.5 pH na precipitação das proteínas com sulfato de amônio**

Extratos brutos obtidos da extração das proteínas da FFM com água destilada na proporção 1:20 (p/v) tiveram seus pH ajustados para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, com soluções de HCl e NaOH e uso de um peagâmetro, após a adição de sulfato de amônio a 80% de saturação, sob agitação magnética. Após 24 horas de repouso, os precipitados foram recuperados por centrifugação, ressuspensos em solução salina tamponada e submetidos à diálise extensiva contra água destilada. Em seguida, mediram-se o teor protéico e a atividade hemaglutinante em cada pH.

### **3.6 Liofilização**

O material dialisado foi submetido à liofilização até peso constante, e armazenado em frasco fechado em dessecador, à temperatura ambiente, para subsequente purificação.

### **3.7 Purificação das proteínas**

A purificação das proteínas do material liofilizado foi realizada em coluna cromatográfica de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow (26mm/100mm), utilizando um gradiente de NaCl 0,2mol/L a 1,0mol/L, para a eluição das proteínas ligadas à matriz.

A coluna foi previamente equilibrada com a solução salina tamponada antes da aplicação da amostra, até que a leitura em 280 nm permanecesse constante, com valores abaixo de 0,02. A seguir, 40mg de liofilizado dissolvidos em 30mL da mesma solução salina tamponada foram aplicados à coluna, sob um fluxo constante de 4mL/min, com auxílio de uma bomba peristáltica. Depois, foram aplicados, ininterruptamente, 100mL de água destilada para a remoção do material não ligado à coluna e, logo em seguida, soluções de 100mL de NaCl de concentrações crescentes variando de 0,2mol/L até 1,0mol/L, para estabelecer o gradiente de eluição das proteínas ligadas à matriz. O eluato foi continuamente recolhido em frações de 8mL com o auxílio de coletor de frações e monitorado por espectrofotômetro, em 280 nm.

As frações correspondentes à faixa dos picos obtidos foram dialisadas e liofilizadas para posteriores dosagem de proteínas e ensaios de atividade hemaglutinante.

### **3.8 Atividade hemaglutinante**

O ensaio de atividade hemaglutinante foi realizado no extrato bruto, nas frações obtidas após a precipitação com sulfato de amônio e diálise e nas frações obtidas no processo de purificação, segundo metodologia descrita por Calderón de la Barca et al. (1985).

As amostras em triplicatas foram diluídas com a solução salina tamponada em placa de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços cada uma. Alíquotas de 100µL de amostra foram misturadas com igual volume de

solução salina tamponada e submetidas a uma série de diluições na base 2 ( $2^0$ ,  $2^1$ ,  $2^2$ ,  $2^3$ , etc.). Em seguida, a amostra diluída foi incubada com 100 $\mu$ L de suspensão de hemácias a 2%, preparada com sangue humano tipo A Rh positivo, em temperatura ambiente. Foram realizadas leituras da aglutinação das hemácias visualmente, após 60 e 90 minutos. A atividade hemaglutinante foi determinada pela maior diluição que ainda apresentava aglutinação visível das hemácias. Os poços que continham somente a suspensão de eritrócitos serviram como controle negativo.

Os resultados foram expressos em número de unidades hemaglutinantes (UH), que é calculado a partir do inverso do título da maior diluição que ainda apresentou aglutinação visível e em atividade específica, obtida pelo cálculo de UH/mg de proteína. Por exemplo: considerando uma diluição  $2^4$ , o seu título igual a 1/16 e o volume de amostra utilizado no ensaio de 100 $\mu$ L, define-se que a atividade hemaglutinante será de 16 UH/100  $\mu$ L (Kilpatrick & Yeoman, 1978).

Nas frações purificadas, em função da eventual necessidade de cátions divalentes metálicos para a atividade, comum na maioria das lectinas vegetais, foram também realizados ensaios de atividade hemaglutinante utilizando amostras (frações purificadas) misturadas ao extrato bruto fervido (ebulição durante 20 minutos) na proporção 1:1 (v/v).

### **3.9 Determinação de proteínas**

A quantificação de proteínas foi realizada no extrato bruto, nas frações obtidas após a precipitação com sulfato de amônio e diálise e nas frações obtidas do processo de purificação, de acordo com metodologia descrita por Bradford (1976).

O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que

contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (Compton & Jones, 1985). O produto da reação de coloração azul-esverdeada é lido em espectrofotômetro, utilizando albumina sérica bovina como padrão.

### **3.10 Avaliação da toxicidade**

Uma avaliação preliminar da toxicidade aguda das lectinas foi determinada pela injeção intraperitoneal em camundongos Balb-C machos, de todas as frações protéicas obtidas durante o procedimento de purificação. Foram utilizados grupos de 10 camundongos com peso médio de 20g para cada fração, perfazendo um total de 40 animais. As doses, em µg/animal, das frações I, II, III e IV, foram de 2, 3, 54 e 52, respectivamente.

O parâmetro avaliado foi o número de mortes após os períodos de 24 horas e 48 horas. Após esse período, os animais foram observados por mais 72 horas, a fim de detectar eventuais efeitos adversos da administração das frações.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de umidade em triplicatas, das folhas frescas e da farinha de folhas de mandioca (FFM) foram, em g/100g, de  $67,93 \pm 0,06$  e  $8,31 \pm 0,04$ , respectivamente.

### 4.1 Extração das proteínas

Foram realizadas diferentes estratégias de extração das proteínas da FFM, visando maiores rendimento protéico e atividade hemaglutinante. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

**TABELA 2** Teores de proteínas e atividade hemaglutinante de extratos protéicos<sup>a</sup> obtidos da FFM.

Extrator	Proporção FFM:extrator (p/v)	Proteína (mg/g FFM)	Atividade hemaglutinante <sup>b</sup> (UH/100 $\mu$ L)
Água destilada	1:10	0,57	2
NaCl 0,15 mol/L	1:10	0,52	2
Água destilada	1:15	0,78	2
NaCl 0,15 mol/L	1:15	0,77	2
Água destilada	1:20	1,51	4
NaCl 0,15 mol/L	1:20	1,42	4

<sup>a</sup> Os extratos protéicos foram obtidos de 1g de farinha de folhas de mandioca (FFM).

<sup>b</sup> O valor expressa o inverso do título da maior diluição na base 2, em número de unidades hemaglutinantes (UH), em cada 100 $\mu$ L de amostra utilizados no ensaio com sangue humano tipo A Rh +.

Observa-se que a atividade hemaglutinante foi maior na proporção de 1:20 (p/v) e que a água destilada proporcionou maior extração das proteínas. Portanto, o extrator escolhido foi a água destilada, na proporção 1:20 (p/v), para extrair as proteínas da FFM.

Posteriormente, foi realizada extração com água destilada 1:20 (p/v) e três reextrações sucessivas, utilizando o resíduo da filtração da extração anterior. Na terceira reextração, não se detectou proteína. Portanto, duas reextrações foram suficientes para a remoção das proteínas. Os teores de proteína total extraídos na FFM foram iguais a  $9,94\text{mg/g} \pm 0,11$ . Esses resultados demonstram um aumento de 6,58 vezes em relação àqueles obtidos em uma única extração, nas mesmas condições. Então, a reextração do resíduo por duas vezes deve ser empregada para melhorar o rendimento de extração das proteínas da FFM.

## **4.2 Precipitação das proteínas e diálise**

### **4.2.1 Escolha do agente precipitante**

Visando concentrar as proteínas extraídas e reduzir o volume da amostra, o extrato bruto obtido da FFM foi submetido ao procedimento de precipitação.

O extrato protéico aquoso obtido da FFM foi submetido às precipitações sucessivas com valores de saturação crescentes, a fim de determinar em qual fração precipitada estaria concentrada a maior atividade hemaglutinante. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Observa-se que a fração 50% de saturação apresentou os maiores teores de proteína e maior atividade hemaglutinante. No entanto, as frações 25% e 80% também apresentaram níveis de proteínas e atividade hemaglutinante significativos, ao passo que, na fração 90%, o teor protéico foi muito baixo e a atividade hemaglutinante não foi detectada. Portanto, a precipitação com sulfato

de amônio a 80% de saturação foi a escolhida para garantir maior quantidade de proteína e atividade hemaglutinante.

**TABELA 3** Proteína e atividade hemaglutinante das frações precipitadas com sulfato de amônio.

Sulfato de amônio (% de saturação)	Proteína <sup>a</sup> (mg)	Atividade hemaglutinante <sup>b</sup> (UH/100µL)
25	0,260	4
50	0,420	16
80	0,270	4
90	0,058	nd <sup>c</sup>

<sup>a</sup> O extrato bruto aquoso obtido de 5g de farinha de folhas de mandioca apresentou uma quantidade de proteínas de 5,47mg.

<sup>b</sup> O valor expressa o inverso do título da maior diluição na base 2, em número de unidades hemaglutinantes (UH), em cada 100µL de amostra utilizados no ensaio com sangue humano tipo A Rh +.

<sup>c</sup> Não detectada.

O rendimento da precipitação de proteínas na fração 80% foi igual a 17,37% (Tabela 3). Oliveira et al. (2002), trabalhando com cotilédones de *Luetzelburgia auriculata* obtiveram rendimento de 18,99%. Por outro lado, Moreira & Perrone (1977), trabalhando com feijão *Phaseolus vulgaris*, Silva et al. (2001), com sementes de *Bauhinia pentandra* e Zenteno et al. (1988), com cactus *Machaerocereus eruca*, obtiveram rendimentos de precipitação de proteínas de 39,70%, 49,04% e 60,00%, respectivamente. Essa variação pode ser causada por características específicas de cada lectina, como ponto isoelétrico, peso molecular, tempo necessário para precipitação e espécie em que é encontrada, entre outras.

Foram também realizadas precipitações das proteínas extraídas da FFM com sulfato de amônio a 80% de saturação, com períodos de repouso de 48 horas e 72 horas sob refrigeração e observou-se que não houve aumento significativo na precipitação das proteínas.

Adicionalmente, foi realizada a precipitação das proteínas com acetona. Os resultados da Tabela 4 mostram que a atividade hemaglutinante foi maior após precipitação com sulfato de amônio em relação à acetona. Portanto, o sulfato de amônio a 80% de saturação foi escolhido como agente precipitante.

**TABELA 4** Precipitação das proteínas do extrato bruto com sulfato de amônio a 80% de saturação e acetona 1:4 (extrato bruto:acetona).

Agente precipitante	Proteínas <sup>a</sup> ( $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ )	Atividade hemaglutinante <sup>b</sup> (UH/100 $\mu\text{L}$ )
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14,12	32
Acetona	12,59	4

<sup>a</sup> Teores de proteínas em 100 $\mu\text{L}$  de amostra utilizados no ensaio.

<sup>b</sup> O valor expressa o inverso do título da maior diluição na base 2, em número de unidades hemaglutinantes (UH), em cada 100 $\mu\text{L}$  de amostra utilizados no ensaio com sangue humano tipo A Rh +.

Nos ensaios de reextração, foram também realizadas precipitações a 80% de saturação com sulfato de amônio em três repetições. O percentual de precipitação foi de 22,78%  $\pm$  0,76, evidenciando melhora no rendimento da precipitação de proteínas em relação ao valor de 17,37%, obtido com uma única extração. Assim, a reextração do resíduo deve ser utilizada para aumentar a quantidade de proteínas precipitadas.



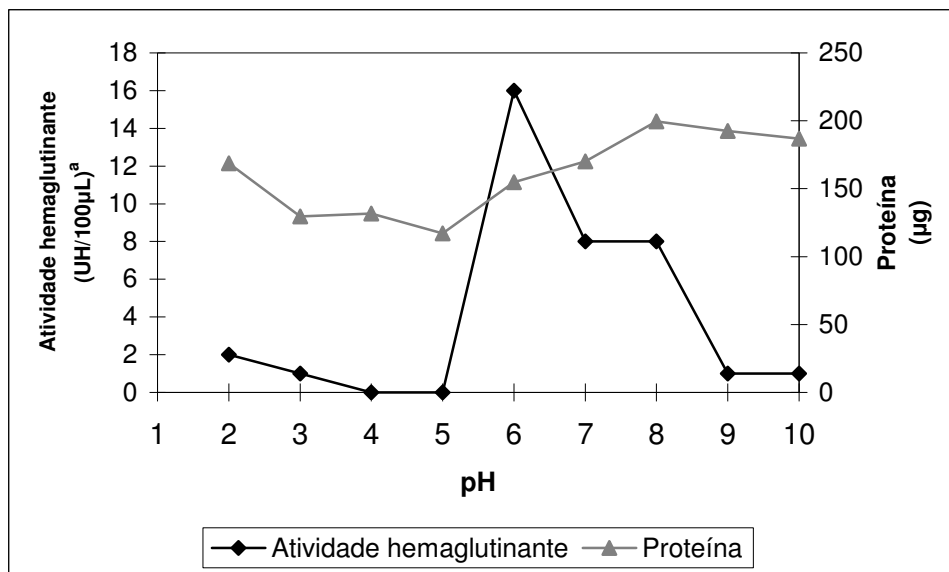
#### **4.2.2 Influência do pH durante a precipitação das proteínas com sulfato de amônio**

No intuito de melhorar o rendimento da precipitação das proteínas extraídas da FFM, foi avaliada a influência do pH durante a precipitação por meio da dosagem de proteínas e atividade hemaglutinante.

Os valores de pH do extrato bruto da FFM, antes e após a adição do sulfato de amônio, foram iguais a 5,9 e 6,1, respectivamente.

Na Figura 2 estão apresentados o teor de proteína e a atividade hemaglutinante dos extratos brutos precipitados com sulfato de amônio a 80% de saturação, em pH variando de 2 a 10.

Observa-se que o maior teor de proteína ocorreu com pH 8, ao passo que a maior atividade hemaglutinante ocorreu com pH 6. Silva et al. (2001), trabalhando com lectina de sementes de *Bauhinia pentandra*, também observaram que os maiores teores de proteínas e as maiores atividades hemaglutinantes ocorriam em valores de pH diferentes. No entanto, sugerem que se deve escolher o pH em que for detectada a maior atividade hemaglutinante. Optou-se, então, por trabalhar em pH 6, priorizando a maior atividade hemaglutinante. Além disso, o pH 6,0 é praticamente igual ao do extrato bruto, não havendo necessidade de ajuste.

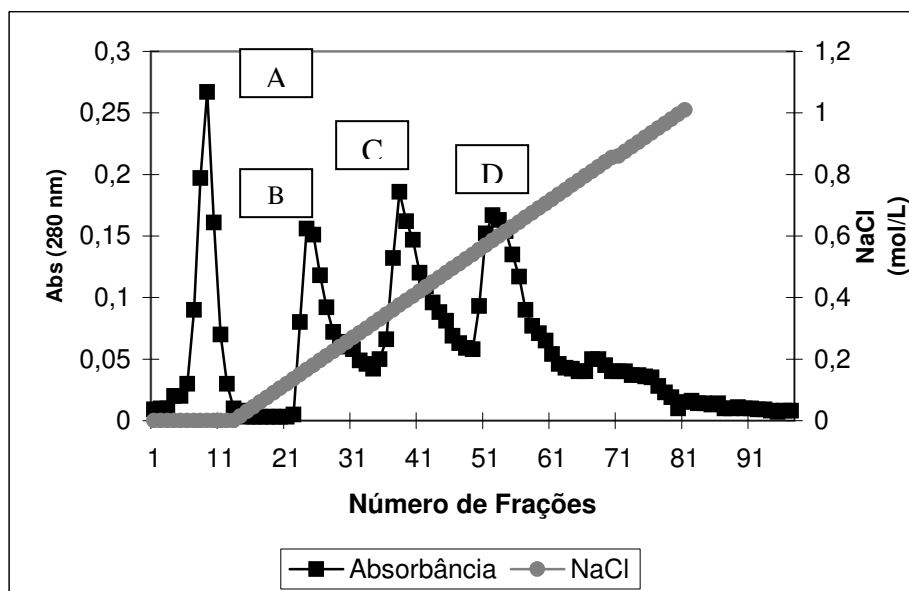


**FIGURA 2** Proteína e atividade hemaglutinante nos extratos brutos precipitados com sulfato de amônio, a 80% de saturação.

<sup>a</sup> O valor expressa o inverso do título da maior diluição na base 2, em número de unidades hemaglutinantes (UH), em cada 100µL de amostra utilizados no ensaio com sangue humano tipo A Rh +.

### 4.3 Purificação das proteínas

Na Figura 3 é mostrado o perfil de eluição da amostra em coluna Q-Sepharose, sendo recolhido um total de 100 frações. Observam-se quatro picos A, B, C, D, com absorvâncias máximas em 280 nm iguais a 0,267, 0,156, 0,186 e 0,167, respectivamente. O pico A corresponde às frações de 7 a 11, o B de 23 a 27, o C de 37 a 41 e o D de 51 a 55. Verifica-se que todas as quatro frações protéicas foram retiradas da coluna antes que a concentração do gradiente atingisse o valor de 0,7mol/L de NaCl. A partir desse ponto, até o fim do gradiente em 1,0mol/L de NaCl, não foi demonstrada a presença de qualquer outro pico.



**FIGURA 3** Perfil de separação das proteínas obtidas do extrato aquoso da farinha de folhas de mandioca.

Coluna Q-Sepharose Fast Flow: 26mm x 100mm, volume aproximado de 56mL. Frações de 8mL foram coletadas sob um fluxo constante de 4mL/minuto e lidas em espectrofotômetro em 280 nm. Gradiente de eluição: volumes de 100mL de NaCl 0,2mol/L a 1,0mol/L (500mL).

O pico A correspondente à proteína não ligada à matriz e que foi eluída com água destilada foi denominado fração I. Os picos B, C e D, cujas proteínas foram retidas na coluna e eluídas após aplicação do gradiente de NaCl, foram denominados de frações II, III e IV, respectivamente. O perfil de eluição se repetiu a cada corrida cromatográfica realizada.

#### **4.4 Atividade hemaglutinante e dosagem de proteínas das frações purificadas**

Os teores de proteínas e atividade hemaglutinante das frações são apresentados na Tabela 5, em que verifica-se que as frações purificadas não apresentaram atividade hemaglutinante detectável. Este resultado poderia ser devido à falta de algum fator perdido durante a purificação. Assim, testou-se a atividade hemaglutinante em um extrato bruto fervido e em um extrato bruto não fervido, tendo sido detectada apenas no extrato bruto não fervido. A fervura, portanto, acarretou desnaturação das proteínas e, como conseqüência, perda da atividade hemaglutinante. Dessa forma, ao misturar o extrato bruto fervido (sem atividade hemaglutinante, mas contendo o fator perdido na purificação) às frações purificadas (também sem atividade hemaglutinante), seria possível avaliar a necessidade ou não desse fator, para a atividade hemaglutinante das frações purificadas. Então, misturou-se o extrato bruto fervido às frações e a atividade hemaglutinante foi detectada, sendo mais elevada nas frações III e IV.

Esses resultados indicam que algum fator necessário à atividade hemaglutinante das frações purificadas foi perdido durante a etapa de purificação. Vários autores relatam que cátions metálicos, como  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$ , são fatores necessários para a atividade hemaglutinante da maioria das lectinas vegetais (Liener, 1980; Sharon & Lis, 1990). Dessa forma, os resultados sugerem que os fatores perdidos na purificação podem ser cátions e que as frações purificadas necessitam desses cátions para apresentar sua atividade hemaglutinante. Ensaio de atividade com adição de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  às frações purificadas devem ser realizados para confirmar ou afastar essa hipótese.

**TABELA 5** Teores de proteínas e atividade hemaglutinante das frações purificadas.

Fração	Sem adição de extrato bruto fervido		Com adição de extrato bruto fervido	
	Proteínas ( $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ ) <sup>a</sup>	Atividade hemaglutinante <sup>b</sup> (UH/100 $\mu\text{L}$ )	Proteínas ( $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ ) <sup>d</sup>	Atividade hemaglutinante <sup>c</sup> (UH/100 $\mu\text{L}$ )
I	0,10	nd <sup>c</sup>	0,05	AND <sup>f</sup>
II	0,15	nd	0,08	AND
III	1,52	nd	0,76	1
IV	0,76	nd	0,38	1

<sup>a</sup> Teores de proteínas, em 100 $\mu\text{L}$ , das frações utilizadas no ensaio.

<sup>b</sup> O valor expressa o inverso do título da maior diluição na base 2, em número de unidades hemaglutinantes (UH), em cada 100 $\mu\text{L}$  de amostra utilizados no ensaio com sangue humano tipo A Rh +.

<sup>c</sup> Não detectada.

<sup>d</sup> Teores de proteínas, em 100 $\mu\text{L}$  da mistura (50 $\mu\text{L}$  do extrato bruto fervido + 50 $\mu\text{L}$  da fração purificada) utilizada no ensaio.

<sup>e</sup> Maior diluição da mistura (50 $\mu\text{L}$  do extrato bruto fervido + 50 $\mu\text{L}$  da fração purificada). O valor é expresso como em b.

<sup>f</sup> Atividade detectada apenas na amostra não diluída (AND), correspondente ao primeiro poço da placa de microtitulação, antes de iniciar a diluição com solução salina.

#### 4.5 Recuperação de proteínas e atividade hemaglutinante em vários estágios de purificação.

Na Tabela 6 estão apresentados a atividade específica e os teores de proteínas durante os estágios de purificação do extrato aquoso da FFM.

Observa-se que a recuperação das proteínas em cada estágio de purificação foi muito baixa, no máximo de 11%. Já a atividade específica aumentou com a purificação, tendo a fração I (não retida na coluna) a maior atividade específica (13.334 UH/mg proteína), sugerindo maior poder hemaglutinante. Entre as frações retidas na coluna (II, III e IV), a II se destacou com uma atividade específica de 8.696 UH/mg proteína.

**TABELA 6** Teores de proteínas e atividade específica em vários estágios de purificação das proteínas da farinha de folhas de mandioca.

Amostra	Proteína		Atividade específica (UH <sup>b</sup> /mg proteína)
	Total (µg)	µg/100µL	
Extrato Bruto <sup>a</sup>	87.360,0	8,73	458
Precipitado a 80%	9.600,0	11,83	2.705
Fração I	21,4	0,15	13.334
Fração II	36,6	0,23	8.696
Fração III	641,2	2,29	1.747
Fração IV	526,2	1,14	3.509

<sup>a</sup> Extrato bruto aquoso obtido de 50g de farinha de folhas de mandioca.

<sup>b</sup> Inverso do título da maior diluição na base 2, em número de unidades hemaglutinantes (UH).

Wong & Ng (2006), trabalhando com banana *Musa basjoo*, Cavada et al. (1998), com sementes de *Vatairea macrocarpa* e Zenteno et al. (1988), com cactus *Machaerocereus eruca*, obtiveram frações purificadas com atividade específica em UH/mg de proteína de 5.324, 7.880 e 9.326, respectivamente. Comparando-se com os resultados deste trabalho, verifica-se que a fração II apresenta atividade específica (8.696 UH/mg proteína) intermediária e a fração I, atividade específica (13.334 UH/mg proteína) superior.

#### 4.6 Avaliação da toxicidade

A injeção intraperitoneal das frações I, II, III e IV, nas doses de 2, 3, 54 e 52µg/20g de peso do animal, respectivamente, não acarretaram nenhuma morte após 24, 48 e 120 horas. Também não foi observada qualquer reação adversa ou alteração no comportamento dos animais. Essas doses foram escolhidas em função da quantidade de proteína obtida. A dose letal (DL<sub>50</sub>) de lectinas vegetais

varia bastante. Lectinas isoladas de soja *Glycine max* (Vasconcelos et al., 1994), de *Abrus pulchellus* (Ramos et al., 1998) e de feijão *Phaseolus acutifolius* (Reynoso-Camacho et al., 2003) apresentaram DL<sub>50</sub> iguais a 140, 31 e 22.000 µg/20g de peso do animal, respectivamente.

Não existem informações na literatura sobre a necessidade de metais como Ca<sup>+2</sup> e Mn<sup>+2</sup> para a ocorrência da toxicidade de lectinas, a exemplo do que ocorre com a atividade hemaglutinante. Portanto, novos ensaios com animais, na presença e na ausência desses cátions e com doses mais elevadas das frações purificadas, devem ser realizados.

## 5 CONCLUSÕES

Das várias formas de extrair as proteínas da farinha de folhas de mandioca, a água destilada, na proporção 1:20 (p/v) acarreta maiores extratibilidade protéica e atividade hemaglutinante.

O melhor agente precipitante é o sulfato de amônio a 80% de saturação em pH 6,0, no qual a atividade hemaglutinante é maior.

Na purificação das proteínas obtêm-se quatro picos, A, B, C e D. Todas as proteínas apresentam atividade hemaglutinante, todavia, as dos picos A e B, denominadas frações I (não retida na coluna) e II (retida na coluna), se destacam.

As doses em  $\mu\text{g}/20\text{g}$  de peso do animal das frações I, II, III e IV iguais a 2, 3, 54 e 52, respectivamente, empregadas nos testes de toxicidade, não são letais aos camundongos.



## 6 PERSPECTIVAS

Continuar a purificação das proteínas extraídas da FFM, utilizando coluna cromatográfica de afinidade.

Caracterizar as frações protéicas purificadas, determinando-se peso molecular, estabilidade térmica, composição de aminoácidos e digestibilidade protéica entre outros.

Avaliar propriedades específicas por meio de ensaios de inibição de aglutinação, especificidade por açúcares e requerimento de metais para hemaglutinação e atividade tóxica.

Continuar a investigação da toxicidade aguda com ensaios biológicos, usando concentrações mais elevadas e adicionando metais como  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  e ensaios de toxicidade crônica e subletal.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAEV, F. I.; de MEJIA, E. G. Antitumor effect of plant lectins. **Nat-Toxins**, Dordrecht, v. 5, n. 4, p. 157-163, 1997.

ANTUNES, P. L.; BILHALVA, A. B.; ELIAS, M. C. SOARES, G. J. D. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L. ), cultivares rico 23, carioca, piratã-1 e rosinha-G2. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 12-18, jan./abr. 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of the analytical chemists**. 17. ed. Washington, 2000.

BALZARINI, J.; VAN LAETHEM, K.; HATSE, S.; VERMEIRE, K.; de CLERCQ, E.; PEUMANS, W.; VAN DAMME, E.; VANDAMME, A.; BÖHLMSTEDT, A.; SCHOLS, D. Profile of Resistance of Human Immunodeficiency Virus to Mannose-Specific Plant Lectins. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, n. 19, p. 10617-10627, Oct. 2004.

BARDOCZ, S.; GRANT, G.; PUSZTAI, A. The effect of phytohaemagglutinin at different dietary concentrations on the growth, body composition and plasma insulin of the rat. **British Journal of Nutrition**, New York, v. 76, n. 4, p. 613-626, Oct. 1996.

BARRIENTOS, L. G.; GRONENBORN, A. M. The highly specific carbohydrate-binding protein cyanovirin-N: structure, anti-HIV/Ebola activity and possibilities for therapy. **Mini-Reviews Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 5, n. 1, p. 21-31, Jan. 2005.

BOLETI, A. P. de A. **Isolamento, caracterização físico-química e estudo da atividade inseticida e fungicida da lectina de sementes de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk.** 2003. 98 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BROEKAERT, W. F.; VAN PARIJS, J.; LEYNS, F.; JOOS, H.; PEUMANS, W. J. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. **Science**, Washington, v. 245, n. 4922, p. 1100-1102, Sept. 1989.

CALDERÓN de la BARCA, A. M.; OCHOA, J. L.; VALENCIA, M. E. Effect of the extraction of a hemagglutinin on the nutritive value of *Amaranthus leocarpus* seeds. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 1700-1702, Nov./Dec. 1985.

CÂMARA, F. S.; MADRUGA, M. S. Cyanic acid, phytic acid, total tannin, and aflatoxin contents of a Brazilian (Natal) Multimistura preparation. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 33-36, jan./abr, 2001.

CARVALHO, V. D. de.; KATO, M. do S. A. Potencial de utilização da parte aérea da mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 145, p. 23-28, jan. 1987.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; SOUSA, F. A. M. de; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 675-680, Oct. 1998.

CHEW, M. Y. Cyanide content of tapioca (*Manihot utilissima*) leaf. **Malaysian Agricultural Journal**, Kuala Lumpur, v. 48, p. 354-356, 1972.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G.; Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.

COOPER, T. G. **The tools of biochemistry**. New York: Willey-Interscience Publication, 1942. 423 p.

CORRÊA, A. D. **Farinha de folhas de mandioca – (*Manihot esculenta* Crantz cv. Baiana) – Efeito de processamentos sobre alguns nutrientes e antinutrientes**. 2000. 108 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CORRÊA, A. D.; SANTOS, S. R. dos; ABREU, C. M. P. de; JOKL, L.; SANTOS, C. D. dos. Remoção de polifenóis da farinha de folhas de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 159-164, abr./jun. 2004.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca\\_centrosul/importancia.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_centrosul/importancia.htm)>. Acesso em: 10 set. 2005.

FENG, K.; LIU, Q. H.; NG, T. B.; LIU, H. Z.; LI, J. Q.; CHEN, G.; SHENG, H. Y.; XIE, Z. L.; WANG, H. X. Isolation and characterization of a novel lectin from the mushroom *Armillaria luteo-virens*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, n. 4, p. 1573–1578, July 2006.

FONSECA, S. V.; VIEIRA, C.; MININ, V. P. R.; CARDOSO, A. A. Folhas verdes de feijão na alimentação humana: avaliação sensorial, adubação nitrogenada e desfolhamento. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 161-167, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em 11 jan. 2007.

GOLDSTEIN, I. J. Lectin Structure-Activity: The Story Is Never Over. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 22, p. 6583-6585, Oct. 2002

KAUR, A.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; SEXANA, A. K.; PANDITA, R. M.; SHAMNUGAVEL, M. Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 66, n. 16, p. 1933-1940, Aug. 2005.

KILPATRICK, D. C.; YEOMAN, M. M. Purification of the Lectin from *Datura stramonium*. **Biochemical Journal**, London, v. 175, n. 3, p. 1151-1153, 1978.

LIENER, I. E. **Toxic constituents of plant foodstuffs**. 2. ed. New York: Academic Press, 1980. 502 p.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular. **Chemical Reviews**, Washington, v. 98, n. 2, p. 637-674, Mar./Apr. 1998.

LOREZI, J. O.; DIAS, C. A. C. **Cultura da mandioca**. Campinas: CATI, 1993. 41 p. (Boletim Técnico CATI, n. 211)

LORIS, R.; HAMELRYCK, T. , BOUCKAERT, J. , WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochemistry Biophysica Acta**, Paris, v. 1383, n. 1, p. 9-36, Mar. 1998.

MACEDO, M. L.; DAMICO, D. C.; FREIRE, M. G.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koeleria paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 10, p. 2980-6, May 2003.

MADRUGA, M. S.; CÂMARA, F. S. The chemical composition of multimistura as a food supplement. **Food Chemistry**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 41-44, Jan. 2000.

MELO, D. S. de. **Farinha de folhas de mandioca: efeitos sobre a peroxidação e o perfil lipídico plasmático e hepático de ratos**. 2005. 74 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobiotecnologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MODESTO, E. C.; SANTOS, G. T.; VIDIGAL FILHO, P. S.; ZAMBOM, M. A.; VILELA, D.; JOBIM C. C.; FARIA, K. P.; DETMANN, E. Composição química das folhas de cinco cultivares de mandioca (*Manihot Esculenta*, Crantz) em diferentes épocas de colheita. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBZ, 2001. p. 1033-1034.

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. . Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 5, p. 783-787, 1977.

MURDOCK, L. L.; HUESING, J. E.; NIELSEN, S. S.; PRATT, R. C.; SHADE, R. E. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochemistry**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 85-89, Jan. 1990.

OLIVEIRA, J. T. A; MELO, V. M. M.; CÂMARA, M. F. L.; VASCONCELOS, IL M.; BELTRAMINI, L. M.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M.; PEREIRA, S. P.; FERNANDES, C. F.; NUNES, E. P.; CAPISTRANO, G. G. G.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 301-310, Oct. 2002.

ORTEGA-FLORES, C. I.; COSTA, M. L. A. I.; CEREDA, M. P.; PENTEADO, M. V. C. Avaliação da qualidade protéica da folha desidratada de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Nutrire**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 47-59, jun. 2003.

PAIVA, F. F. de A. **Conservação e armazenamento de raízes de mandioca**. Fortaleza: EPACE, 1994. 40 p. (EPACE Circular Técnica, n. 8).

PEUMANS, W. J.; ZHANG, W.; BARRE, A.; ASTOUL, C. A.; BALINTI-KURTI, P. J.; ROVIRA, P.; ROUGÉ, P.; MAY, G. D.; VAN LEUVEN, F.; TRUFFA-BACHI, P.; VAN DAMME, E. J. M. Fruit-specific lectins from banana and plantain. **Planta**, Berlin, v. 211, n. 6, p. 546-554, Nov. 2000.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant Lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Hants, v. 15, p. 199-227, 1998.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 2, p. 347-352, Oct. 1995.

PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. Biological Effects of Plant Lectins on the Gastrointestinal Tract: Metabolic Consequences and Applications. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, Osaka, v. 8, n. 41, p. 149-165, May 1996.

PUSZTAI, A.; GRANT, G.; GELENCSEÉR, E.; EWEN, S. W. B.; PFÜLLER, U.; EIFLER, R.; BARDOCZ, S. Effects on an orally administered mistletoe (type-2 RIP) lectin on a growth, body composition, small intestinal structure, and insulin levels in young rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 9, n. 1, p. 31-36, Jan. 1998.

RAMOS, M. V.; MOTA, D. M.; TEIXEIRA, C. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. **Toxicon**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 477-484, Mar. 1998.

REYNOSO-CAMACHO, R.; De-MEJIA, E. G.; LOARCA-PINA, G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 21-27, Jan. 2003.

SANTORO, L. G.; GRANT, G.; PUSZTAI, A. Effects of short-term feeding of rats with a highly purified phaseolin preparation. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 61-70, 1997.

SCHLUMBAUM, A.; MAUCH, F.; VOGELI, U.; BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, v. 324, n. 6095, p. 365-367, Nov. 1986.

SECRETARIA DO ESTADO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, Goiás.  
INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em:<<http://www.sectec.go.gov.br/links/institutos/ibge.htm>>. Acesso em: 05 jan. 2007.

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e Nutrição**: fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo: Almed, 1987. 387 p.

SHARON, N. Lectins- carbohydrates complexes of plants and animals. Na atomic. **Trends Biochemical Sciences**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 221-226, June 1993

SHARON, N.; LIS, H Legume lectins--a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 4, n. 14, p. 3198-3208, Nov. 1990.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, Cary, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, Nov. 2004.

SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L. F. **Introducción a la toxicología de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1996, 203 p.

SILVA, A. L. C. da.; HORTA, A. C. G.; MOREIRA, R. de A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) vog. Ex. Steua. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 13, n. 3, p. 251-261, dez. 2001.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectin: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, n. 6, p 575-692, 1998.

VAN DAMME, J. M.; BARRE, A.; ROUGE, P.; PEUMANS, W. J. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. **TRENDS in Plant Science**, London, v. 9, n. 10, p. 484-489, Oct. 2004

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W. F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, Berlin, v. 183, n. 2, p. 258-262, 1991.

VAN PARIJS, J.; JOOSEN, H. M.; PEUMANS, W. J.; GEUNS, J. M.; VAN LAEIRE, A. J. Effect of the lectin UDA (*Urtica dioica* agglutinin) on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleemii* Burgeff. **Archives Microbiology**, New York, v. 158, n. 1, p. 19-25, June 1992.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 385-403, Sept. 2004.

VASCONCELOS, I. M.; TRENTIM, A.; GUIMARÃES, J. A.; CARLINI, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 312, n. 2, p. 357-366, Aug. 1994.

WANG, H. X.; NG, T. B. Examination of Lectins, Polysaccharopeptide, Polysaccharide, Alkaloid, Coumarin and Trypsin Inhibitors for Inhibitory Activity Against Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase and Glycohydrolases. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 67, n. 7, p. 669-672, Oct. 2001.

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

WOBETO, C. **Nutrientes e antinutrientes da farinha de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em três idades da planta**. 2003. 82 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WOBETO, C.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P. de; SANTOS, C. D. dos; ABREU, J. R. de. Nutrients in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf meal at three ages of the plant. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 865-869, dez. 2006.

WONG, J. H.; NG, T. B. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 234-243, Feb. 2006.



ZENTENO, E.; DEBRAY, H.; MONTREUIL, J. Purification and partial characterization of two lectins from the cactus *Machaerocereus eruca*. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 95-100, Sept. 1988.