

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LECTINA
DE FOLHAS DE MANDIOCA
(*Manihot esculenta* Crantz)**

MARIA CRISTINA SILVA

2008

MARIA CRISTINA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LECTINA DE FOLHAS DE
MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz).**

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

Orientadora

Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

MARIA CRISTINA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LECTINA DE FOLHAS DE
MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz).**

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

APROVADA em 20 de fevereiro de 2008.

Profa. Dra. Adelir Aparecida Saczk

UFLA

Prof. Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima

UFLA

Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus,
por ser meu refúgio e me amparar
durante os momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Geraldo e Aparecida,
pelo exemplo de determinação e por
toda dedicação e carinho.

As minhas irmãs, Janáina e Talita e
à pequena Sarah, por nossa amizade,
e união.

À minha avó, Dona Neguinha,
e minhas tias, Rita e Lurdinha,
por me acolherem com tanto
carinho.

E aos meus amigos Luciana, Chrystian e Simone, pelos
conselhos, ajuda, carinho e grande amizade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força e iluminar o meu caminho.

Aos meus pais, pelo apoio e carinho fundamentais na realização deste trabalho.

À professora Angelita Duarte Corrêa, pela orientação, dedicação e amizade, por acreditar em mim e me ajudar a crescer profissionalmente.

Ao professor Custódio Donizete dos Santos, pela co-orientação e disponibilidade.

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 da cromatografia.

Ao professor Luiz Carlos de Oliveira Lima, por fornecer a resina utilizada na cromatografia e pela disponibilidade.

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

Ao professor Luciano Vilela Paiva, pelo espaço cedido no Laboratório de Biologia Molecular para a realização de parte desse trabalho e pelos ensinamentos.

Ao professor Paulo Estevão, que disponibilizou a Clínica Fitossanitária do Departamento de Fitopatologia para a realização dos ensaios biológicos.

A todos os professores do Departamento de Química, pela receptividade.

Ao professor Ruy Carvalho, chefe do Departamento de Química e à professora Celeste Maria Patto de Abreu, coordenadora da pós-graduação, por disponibilizarem recursos para o desenvolvimento do projeto.

Aos funcionários do Departamento de Química, em especial à Miriam e à Xulita, pela atenção e ajuda.

À Flávia, bolsista de iniciação científica, por sua ajuda e contribuição na realização desse trabalho.

Aos funcionários do Laboratório Central de Biologia Molecular, em especial ao Anderson, pela atenção e disponibilidade.

Ao Dartagnan, funcionário do Departamento de Fisiologia Vegetal, pelo apoio e ajuda em qualquer hora.

À Eliane, funcionária do Departamento de Fitopatologia, pela ajuda com os ensaios biológicos.

A todos os amigos da pós-graduação, em especial a Luciana, Chrystian, Abel, Simone, Annete, José Renato, Marcele e Rafaela, pela amizade, apoio e disposição em ajudar.

Ao Departamento de Química e à UFLA, pela oportunidade concedida.

À Capes pelo apoio financeiro.

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

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE SIGLAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Folhas de mandioca: subproduto agrícola x suplemento alimentar.....	4
2.2 Lectinas.....	6
2.2.1 Considerações gerais.....	6
2.2.2 Distribuição e função das lectinas nas plantas.....	8
2.2.3 Classificação das lectinas vegetais.....	9
2.2.4 Atividade antinutricional.....	11
2.2.5 Aplicações biotecnológicas das lectinas vegetais.....	12
2.3 Fungos fitopatogênicos.....	14
2.3.1 Atividade fungicida das lectinas de plantas.....	15
2.3.2 <i>Fusarium oxysporum</i>	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Material biológico e reagentes.....	18
3.2 Colheita, secagem das folhas de mandioca e preparo da farinha de folhas de mandioca.....	18
3.3 Métodos de extração das proteínas.....	19
3.4 Dosagem de proteínas.....	20
3.5 Atividade hemaglutinante.....	20
3.6 Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante.....	21
3.7 Efeito de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) na atividade hemaglutinante.....	21
3.8 Precipitação das proteínas e diálise.....	22
3.9 Purificação parcial das proteínas.....	23
3.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS	24
3.11 Avaliação da atividade fungicida.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27

4.1 Métodos de extração das proteínas.....	27
4.2 Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante.....	30
4.3 Efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante.....	31
4.4 Precipitação das proteínas e diálise.....	33
4.5 Purificação parcial das proteínas.....	34
4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.....	36
4.7 Avaliação da atividade fungicida.....	38
5 CONCLUSÕES.....	40
6 PERSPECTIVAS.....	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
8 ANEXO.....	52

LISTA DE SIGLAS

AH	Atividade hemaglutinante
BDA	Batata, dextrose, agar
BOD	Incubadora com “biological oxygen demand”
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
FFM	Farinha de folhas de mandioca
Gal	Galactose
GalNAc	N-acetilgalactosamina
kDa	Kilodalton
nm	Nanômetros
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	Tetrametilenodiamina
Tris	Trihidroximetilaminometano
UH	Unidades hemaglutinantes

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Composição centesimal ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) e fatores antinutricionais ($\text{g } 100\text{g matéria seca}^{-1}$) da farinha de folhas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz cv. Cacao).....	6
TABELA 2	Rendimentos médios de proteínas ($\text{g}/100\text{g}$) da farinha de folhas de mandioca.....	28
TABELA 3	Atividade hemaglutinante com dois extratores e vários tempos de extração.....	29
TABELA 4	Aglutinação de hemácias incubadas com soluções salinas contendo diferentes concentrações de Ca^{2+} e Mn^{2+} e da mistura de ambos os íons, na ausência de lectina.....	32
TABELA 5	Proteína total e atividade hemaglutinante no extrato protéico e no precipitado com sulfato de amônio a 80%.....	33
TABELA 1 A	Resumo da análise de variância do rendimento protéico das extrações.....	53
TABELA 2 A	Resumo da análise de variância do crescimento micelial do fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	53

LISTA DE FIGURAS

	Página	
FIGURA 1	Curvas e equações de regressão representativas dos valores de rendimento protéico de dois extratores, em função do tempo de extração.....	28
FIGURA 2	Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante da lectina da farinha de folhas de mandioca.....	30
FIGURA 3	Perfil cromatográfico do precipitado protéico da farinha de folhas de mandioca.....	35
FIGURA 4	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), com SDS das frações de purificação da lectina da farinha de folhas de mandioca.....	37
FIGURA 5	Bioensaio realizado com o extrato protéico da FFM precipitado com sulfato de amônio a 80%, sobre o crescimento micelial do fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	38
FIGURA 6	Efeito do extrato protéico da FFM precipitado com sulfato de amônio a 80%, sobre o crescimento micelial do fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	39

RESUMO

SILVA, Maria Cristina. **Caracterização parcial da lectina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2008. 53p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG¹.

Lectinas são proteínas (ou glicoproteínas) ligantes de carboidratos e, em função dessa propriedade, são capazes de provocar a aglutinação de células, principalmente hemácias (fenômeno conhecido como hemaglutinação). São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em muitos organismos, desde vírus e bactérias, até animais e plantas. Algumas dessas proteínas são tóxicas e ou antinutritivas, e, quando ingeridas, provocam efeitos fisiológicos adversos no organismo. No entanto, as lectinas despertam interesse científico, desde que representam importantes ferramentas em pesquisas nas áreas biológicas e médicas. A farinha de folhas de mandioca (FFM), um subproduto agrícola, vem sendo utilizada como suplemento alimentar para populações carentes. Dessa forma, o estudo da lectina da FFM é de extrema importância tanto pela sua ação antinutricional, como por suas possíveis aplicações biotecnológicas, agregando valores a esse subproduto. O objetivo da realização deste trabalho foi extrair, purificar e caracterizar a lectina de FFM quanto às propriedades químicas e biológicas. Para a extração das proteínas da FFM, foram testados vários métodos de extração, em que se utilizaram dois extratores, água destilada e solução salina tamponada (NaCl 0,15mol L⁻¹, tampão fosfato pH 7,4) e quatro tempos de extração, 15, 60, 120 e 180 minutos. O método de extração que proporcionou maior atividade hemaglutinante (AH) foi obtido quando se utilizou água como extrator, em um tempo de 15 minutos (proporção 1:20 m/v). A lectina da FFM apresentou estabilidade térmica numa faixa de temperatura de 40° a 70°C e não é dependente de íons Ca²⁺ e Mn²⁺ para exercer sua AH. O extrato protéico foi precipitado com sulfato de amônio a 80% de saturação e o precipitado foi submetido à cromatografia em coluna de bioafinidade Sepharose CL-4B. A cromatografia mostrou um pico que apresentou AH e, quando levado à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS revelaram-se três bandas protéicas de 64, 61 e 58 kDa. O extrato protéico de FFM precipitado com sulfato de amônio a 80% de saturação não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum*, na concentração de até 100µg mL⁻¹.

¹ Comitê Orientador: Dra. Angelita Duarte Corrêa (Orientadora), Dr. Custódio Donizete dos Santos, Dra. Celeste Maria Patto de Abreu (Co-orientadores) – DQI/UFLA.

ABSTRACT

SILVA, Maria Cristina. **Partial characterization of lectin of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2008. 53p. Dissertation (Master in Agrochemistry) – Federal University of Lavras, Lavras, MG¹.

Lectins are carbohydrates binding proteins (or glycoproteins) and owing to this property are capable of provoking agglutination of cells, mainly red blood cells (phenomenon known as hemagglutination). Are widely distributed in nature, found in a number of organisms, since viruses and bacteria till animals and plants. Some of these proteins are toxic and or antinutritive and when ingested they incite adverse physiologic effects in the organism. Nevertheless, lectins awake the scientific interest, since they stand for important tools in research in the biologic and medical areas. Cassava leaf flour (FFM), a sub product of agricultural has been utilized as a food supplement for low income populations. Thus, the study of FFM lectin is extremely important both for its anti nutritional action and for its possible biotechnological applications, adding values to the sub products. The objective of this work was extracting, purifying and characterizing FFM lectin both its chemical and biological properties. For the extraction of FFM proteins, several extraction methods have been tested, in which two extractors were employed: distilled water and buffered saline solution (0.15mol L^{-1} NaCl, phosphate buffer pH 7.4) and four extraction times, 15, 60, 120 and 180 minutes. The extraction method which provided highest hemagglutinating activity (AH) was obtained when water was utilized as an extractor, in a time of 15 minutes (ratio 1:20 m/v). The FFM lectin file a thermal stability in a temperature range of 40 to 70° C and it is not dependent on Ca^{2+} and Mn^{2+} ions to exercise its AH. The protein extract was precipitated with ammonium sulfate at 80% of saturation and the precipitate was submitted to Sepharose CL-4B bio affinity column chromatography. Chromatography showed a peak which presented AH and when taken to polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS revealed three protein bands of 64, 61 and 58 kDa. The FFM's protein extract that precipitated with ammonium sulfate at 80% of saturation don't presented inhibitory effect don mycelial growth of the fungus *Fusarium oxysporum*, at the concentration of up to $100\mu\text{g mL}^{-1}$.

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

1 INTRODUÇÃO

Dos diferentes tipos de exposição humana a agentes químicos, nenhuma é tão complexa como a que ocorre com o uso dos alimentos. Esta complexidade pode ser atribuída à quantidade e à diversidade de compostos químicos eventualmente presentes ou constituintes do próprio alimento.

Muitos alimentos da dieta humana, além da porção nutritiva, podem conter fatores antinutricionais, que são substâncias capazes de bloquear o aproveitamento de outras substâncias ou que reúnem propriedades tóxicas, provocando efeitos fisiológicos adversos no organismo.

A maioria das substâncias que compõem os alimentos consumidos pelo homem, exceto os nutrientes, não está, ainda quimicamente, muito bem caracterizada e, como consequência, seus eventuais efeitos nocivos são ainda desconhecidos, seja isoladamente ou resultante de interações.

A desnutrição energético-protéica constitui um dos principais problemas nutricionais no Brasil, com elevada prevalência na população de baixa renda. Os indivíduos mais vulneráveis, por suas exigências nutricionais, são as crianças, cujo desenvolvimento físico e mental está condicionado ao estado de nutrição dos primeiros anos de vida.

Com o intuito de diminuir o índice de desnutrição no Brasil, várias organizações governamentais e não governamentais, como a Pastoral da Criança, vêm incentivando o uso da “multimistura” como suplemento alimentar para populações carentes. A formulação da “multimistura” varia de acordo com a disponibilidade local dos ingredientes, mas basicamente é composta de alimentos não convencionais na dieta habitual, entre eles os farelos, o pó de casca de ovo, as folhas verde-escuras (folhas de mandioca, por exemplo) e as sementes. No entanto, a biodisponibilidade de seus nutrientes e a presença de fatores antinutricionais têm gerado polêmica e oferecido restrições ao seu emprego como tal (Vizeu et al., 2005).

A farinha de folhas de mandioca (FFM), um dos constituintes da “multimistura”, possui alto teor em proteínas, vitaminas e minerais, entretanto, apesar do seu potencial nutritivo, a FFM possui algumas substâncias antinutritivas e ou tóxicas, como cianeto, polifenóis (taninos), nitrato, ácido oxálico, saponinas, inibidores de tripsina e uma classe de proteínas denominada lectinas, as quais serão enfatizadas neste trabalho.

A purificação e a caracterização das lectinas são de extrema importância, não só no que diz respeito à sua ação antinutricional, mas também devido ao seu uso potencial em pesquisas nas áreas biológicas e médicas.

A lectina purificada de folhas de mandioca poderia encontrar inúmeras aplicações biotecnológicas, como, por exemplo, a sua utilização como material de afinidade em cromatografia de coluna, como agente fungicida, bactericida e inseticida entre outras. Além disso, o estudo detalhado da lectina da folha de mandioca poderá trazer subsídios para o consumo seguro da farinha de folhas.

A busca de produtos naturais, que possam apresentar aplicações biotecnológicas, como as citadas acima, é extremamente relevante. No caso da folha de mandioca, a agregação de valor ao que antes era considerado um subproduto agrícola, além de gerar benefícios econômicos, contribui para o meio ambiente, uma vez que milhares de toneladas desse resíduo deixariam de ser descartadas, para serem utilizadas nas mais diversas áreas biológicas e médicas.

Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi extrair, isolar e purificar parcialmente a lectina da FFM, caracterizando-a quanto às propriedades químicas e biológicas. Os objetivos específicos foram: (1) determinar o método de extração das proteínas da FFM, (2) realizar a precipitação dessas proteínas, (3) purificar a lectina de folhas de mandioca em coluna cromatográfica, (4) avaliar a lectina de folhas de mandioca quanto à sua estabilidade térmica, influência dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} na atividade hemaglutinante e a massa

molecular aparente e (5) avaliar a ação fungicida do extrato protéico obtido da FFM sobre o fungo *Fusarium oxysporum*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Folhas de mandioca: subproduto agrícola x suplemento alimentar

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, é uma planta perene, arbustiva, pertencente à família das Euforbiáceas. Do ponto de vista econômico, a parte mais importante da planta é a raiz, rica em fécula (amido), utilizada na alimentação humana e animal ou como matéria-prima para diversas indústrias (Fraife Filho & Bahia, 2006).

Originária da América do Sul, a mandioca constitui um dos principais alimentos energéticos para cerca de 500 milhões de pessoas, sobretudo nos países em desenvolvimento. Ela pode ser cultivada em pequenas áreas com pouca tecnologia, pois apresenta características que facilitam sua difusão, como, por exemplo, fácil adaptação a solos pobres, resistência à seca, além de conseguir sobreviver junto a ervas daninhas e pragas, tendo como resultado uma alta resistência biológica (Penteado & Flores, 2007).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial, com uma produção, em 2007, de 27,3 milhões de toneladas e estimativa semelhante para 2008 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2008).

Segundo Jesus et al. (1987), a utilização de plantas de maneira especializada provoca o desperdício de componentes nutricionais, no momento do descarte dos restos da cultura. Esses resíduos agrícolas podem apresentar uma fonte adicional de recursos alimentares. A necessidade de se dar uma utilização adequada à parte aérea da mandioca, ou seja, de não considerá-la apenas um subproduto agrícola, baseia-se no grande desperdício deste material que, além de sua alta produtividade, nutricionalmente, apresenta grande potencial para o consumo humano.

Segundo Cereda et al. (2001), por tonelada de raiz são produzidas 2,5 t ha⁻¹ de folhas de mandioca. No Brasil, cerca de 178 mil toneladas de folhas de mandioca são desperdiçadas a cada ano.

Em regiões de solo arenoso e alimento escasso, como o Norte de Minas Gerais e o Nordeste do país, a folha da mandioca é usada no combate à desnutrição, uma vez que este subproduto (parte do alimento normalmente descartada) é um dos constituintes da chamada multimistura. Além da participação nessa mistura, a farinha feita a partir da folha é fornecida na merenda escolar e incluída em cestas básicas para famílias carentes.

Em alguns países da África, as folhas de mandioca são consumidas como vegetal, fazendo parte da dieta regular (Awoyinga et.al., 1995; Gidamis et.al., 1993; Lutaladio, 1984; Lyimo, 1991).

Melo et al. (2007) avaliaram a composição química da farinha de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv. Cacao). Os dados obtidos por este autor para composição centesimal e para alguns fatores antinutricionais encontram-se na Tabela 1.

Apesar do elevado potencial nutritivo das folhas de mandioca, seu consumo está limitado pela presença de alguns fatores antinutricionais, entre eles as lectinas. Apesar de seus possíveis efeitos deletérios, as lectinas despertam interesse científico quando utilizadas de forma purificada, em pesquisas biológicas para fins de diagnósticos clínicos e investigação de estrutura de proteína e carboidratos em células (Silva & Silva, 2000), encontrando também diversas outras aplicações biológicas. Dessa forma, além de suplemento alimentar, a folha de mandioca poderia ser utilizada também como uma fonte de lectinas.

TABELA 1 Composição centesimal (g 100 g⁻¹) e fatores antinutricionais (g 100 g matéria seca⁻¹) da farinha de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv. Cacao).

Constituintes	Teores
Umidade	8,31 ± 0,04
Extrato etéreo	9,20 ± 0,03
Proteína bruta	29,86 ± 0,10
Fibra (FDN ^b)	26,50 ± 2,61
Lignina	16,80 ± 0,40
Cinza	6,51 ± 0,52
ENN ^c	19,98 ± 2,74
Saponina	1,07 ± 0,09
Polifenóis	4,72 ± 0,64
Cianeto	123,61 ± 13,12
Lectina ^d	4,00 ^e

^a Médias de três determinações ± desvio padrão.

^b FDN- fibra detergente neutro.

^c ENN- extrato não nitrogenado

^d Fonte: Pereira (2007)

^e 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 +.

Fonte: adaptado de Melo et al. (2007).

2.2 Lectinas

2.2.1 Considerações gerais

Lectinas são proteínas que reconhecem e se associam de forma reversível, com alta afinidade e especificidade a carboidratos, sem, contudo, promover modificações químicas na estrutura covalente dos mesmos e sem apresentarem atividade enzimática (Gabiús et al., 2002; Loris, 2002; Peumans & Van Damme, 1995).

Embora muitas lectinas reconheçam e se liguem a açúcares simples, tais como glicose, manose, galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina ou fucose, a afinidade é muito maior para com os constituintes de glicoproteínas:

ácido siálico e N-acetilgalactosamina, contendo cadeias de glicanos, encontrados em animais e seres humanos (Peumans & Van Damme, 1996).

A região de interação com açúcares é denominada domínio reconhecedor de carboidratos (DRC) que é altamente conservada em cada tipo de lectina (Ni & Tizard, 1996). O processo de interação a carboidratos ocorre por meio de interações do tipo ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals, entre as hidroxilas dos carboidratos e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da lectina (Weis & Drickamer, 1996).

Ao interagirem com gliconjugados da superfície celular, as lectinas podem promover a formação de ligações cruzadas entre células adjacentes, causando aglutinação das mesmas (Peumans & Van Damme, 1995). Quando o carboidrato reconhecido pela proteína localiza-se na superfície de hemácias, desencadeia o processo de hemaglutinação (Alonso et al., 2001).

A primeira descrição de uma lectina 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).

O termo “lectina”, do latim *legere* = escolher, foi proposto, em 1954, por Boyd & Shapleigh, para denotar a habilidade de ligar-se especificamente a células vermelhas do sistema ABO de grupos sanguíneos (Vasconcelos & Oliveira, 2004).

As lectinas inicialmente foram designadas de hemaglutininas, termo derivado de sua capacidade de aglutinar células vermelhas do sangue. Somente em 1952, foi demonstrado que a propriedade de aglutinação das lectinas estava baseada numa atividade específica de ligação com açúcar na superfície celular (Watkis & Morgan, 1952). A partir de então, estas proteínas puderam ser distinguidas de outras proteínas com base num critério funcional bem definido.

Por esta razão, atualmente, as lectinas são consideradas proteínas ligantes de carboidratos em vez de hem (aglutininas).

As lectinas são geralmente ricas em aminoácidos ácidos e básicos e pobres em aminoácidos contendo enxofre, sendo a maioria de glicoproteína com conteúdo de açúcar variável. Lectinas são, geralmente, glicosiladas e compostas de 2 ou 4 protômeros, ligadas não covalentemente. O peso molecular das lectinas de plantas varia de 8,5 a 265 kDa, como em *Urtica dióica*, conhecida como urtiga (Broekaert et al., 1989) e *Phaseolus lunatus* – feijão-lima (Moreira et al., 1991), respectivamente.

Algumas lectinas são classificadas como metaloproteínas, pois requerem, para a sua atividade hemaglutinante, a presença de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} , para estabilizar os sítios de ligação dos açúcares (Weis & Drickamer, 1996).

Lectinas vegetais apresentam alta estabilidade a variações de temperatura e pH, e resistem a uma grande variedade de enzimas proteolíticas, característica comum à maioria das proteínas que estejam diretamente envolvidas no mecanismo de defesa de plantas (Peumans & Van Damme, 1995). Muitas proteínas relatadas como de defesa, por exemplo, inibidores de proteases (Ryan, 1990), proteínas fungicidas (Broekaert et al., 1992) e inibidores de α -amilase (Boehlmann et al., 1988), sobrevivem a tratamentos que inativariam proteínas celulares normais.

2.2.2 Distribuição e função das lectinas nas plantas

As lectinas são encontradas em muitos organismos, sendo amplamente distribuídas entre vegetais, vírus, bactérias, mamíferos e vários grupos de invertebrados (Gerlach et al., 2005; Kilpatrick, 2002).

Em vegetais, elas são detectadas em centenas de espécies de plantas. A maioria das lectinas vegetais é obtida de semente, embora a sua presença já

tenha sido observada em todos os tipos de tecidos vegetativos, como casca, folhas, caule, frutos e raízes (Sharon & Lis, 2001).

As lectinas de sementes são obtidas, principalmente, de leguminosas, onde são acumuladas no período de maturação e desaparecem após a germinação. As lectinas constituem cerca de 10% das proteínas totais de semente, porém, a quantidade isolada é pequena: varia entre 0,1%-1% deste total (Alencar et al., 2005; Loris, 2002; Sharon & Lis, 2004).

O fato de as lectinas terem larga distribuição em plantas sugere alguma importância fisiológica para estas substâncias (Etzler, 1985; Liener, 1976). Entretanto, as funções fisiológicas das lectinas vegetais ainda não foram completamente elucidadas, embora muitas hipóteses tenham sido sugeridas. Alguns exemplos podem ser citados, como: manutenção e armazenamento, interação planta-microrganismo, defesa contra ataque de insetos e fungos, estimulação mitogênica no processo de germinação, transporte de carboidratos e extensão da parede celular (Santos, 2004). Adicionalmente, algumas plantas respondem a infecções ou a lesões, produzindo lectinas (Millar et al., 1992).

Diversos experimentos indicam, ainda, que as lectinas vegetais são também proteínas de defesa contra animais herbívoros e possuem função na simbiose entre as bactérias fixadoras de nitrogênio (*Rhizobium* spp) e as raízes de leguminosas (Cavada et al., 2001).

2.2.3 Classificação das lectinas vegetais

As lectinas de plantas representam um grupo muito heterogêneo. Estas proteínas diferem entre si, tanto em relação às propriedades bioquímicas e físico-químicas, quanto à sua estrutura molecular, o que está intimamente relacionado com a especificidade por monossacarídeos e a sua atuação biológica.

De acordo com a sua estrutura, as lectinas foram subdivididas em cinco classes principais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas, superlectinas e multilectinas (Van Damme et al., 1998), descritas a seguir:

1. as merolectinas que, possuindo apenas um domínio ligante a açúcares, podem se ligar a células, produzindo modificações fisiológicas nas mesmas, sem, no entanto, serem capazes de aglutiná-las;

2. as hololectinas que possuem mais de um domínio ligante e que se destacam pela sua característica mais marcante, a de aglutinar célula e glicoconjugados;

3. as quimerolectinas que possuem, pelo menos, dois domínios com atividades distintas: um capaz de se ligar a carboidratos e glicoconjugados (domínio B, ligante) e outro capaz de exercer uma atividade enzimática;

4. as superlectinas que correspondem a um tipo especial de quimerolectinas, no qual os dois domínios são ligantes, no entanto, apresentam especificidades distintas;

5. as multilectinas lectinas que apresentam dois sítios ligantes, idênticos, com características de se ligarem a açúcares distintos (galactose e manose).

Recentes avanços na bioquímica, clonagem molecular e análise estrutural das lectinas têm revelado a ocorrência de famílias, divididas de acordo com a estrutura e a evolução conhecidas das proteínas. Entre elas, podem-se destacar as lectinas de leguminosas (Rabijins et al., 2000), as proteínas inativadoras do ribossomo tipo-2 (Van Damme et al., 2000b), as lectinas ligadoras de quitina (Stoeva et al., 2001) que contém domínios específicos, as lectinas de monocotiledôneas ligadoras de manose (Van Damme et al., 2000a) e as lectinas relacionadas à Jacalina (Bourne et al., 1999). As lectinas de leguminosas e as lectinas ligadoras de quitina constituem as classes com maior número (>100) de lectinas já identificadas.

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).

2.2.4 Atividade antinutricional

As lectinas, quando ingeridas com os alimentos, podem reconhecer resíduos de carboidratos presentes nas células intestinais, ligando-se aos mesmos (Vasconcelos & Oliveira, 2004). O fato de as lectinas reconhecerem e ligarem-se a receptores glicosilados presentes nas células intestinais confere a estas proteínas propriedades negativas quanto à interferência nos processos de digestão, absorção e utilização de nutrientes, devido à paralisação do transporte desses nutrientes e à absorção de substâncias nocivas. No entanto, o exato mecanismo de ação das lectinas ainda não está claro (Czapla, 1997; Nevel et al., 1998; Tinjuangjun, 2002).

A diminuição da absorção de nutrientes, com conseqüente perda de proteínas e outros materiais celulares de origem endógena, leva a uma rápida perda de peso e inibição do crescimento de animais experimentais (Sgarbieri, 1987). Além dos efeitos degenerativos nas membranas celulares, as lectinas mostraram a capacidade de inibir várias enzimas intestinais (Vasconcelos & Oliveira, 2004).

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).

Os possíveis efeitos adversos de lectinas em humanos podem ser inferidos somente de experimentos com animais de laboratório. Sob esse aspecto, as alterações observadas no intestino e outros órgãos de camundongos, ratos e porcos demonstraram que as lectinas são capazes de provocar reações

específicas importantes sob o aspecto de segurança alimentar (Peumans & Van Damme, 1996).

2.2.5 Aplicações biotecnológicas das lectinas vegetais

As especificidades das lectinas com relação aos diferentes carboidratos possibilitam a sua utilização em diferentes áreas biológicas e médicas.

Em glicobiologia e glicobioquímica, as lectinas vegetais são utilizadas na investigação estrutural e funcional de carboidratos complexos, de glicoproteínas e para examinar mudanças decorrentes de processos fisiológicos e patológicos na superfície celular (Gabiús et al., 2002; Rüdiger et al., 2000).

As lectinas podem ainda ser imobilizadas em suportes inertes (como por exemplo géis), devido à sua especificidade por carboidratos e são utilizadas em matrizes comerciais de afinidade, empregadas na purificação e na caracterização de polissacarídeos e gliconjugados (Lima et al., 1997).

A caracterização de grupos sanguíneos é também uma das muitas aplicações atribuídas a essa classe de proteínas. Lectinas de *Lotus tetragonolobus* (Lótus) e *Ulex europaeus* (Tojo), ambas específicas de fucose, são empregadas para identificar células tipo O; a lectina de *Dilichos biflorus* é usada para distinguir entre os subgrupos A1 e A2 e a aglutinina de amendoim, específica para Gal(β 1-3)GalNAc, é empregada na detecção de poliaglutinação, uma condição que acompanha processos de infecção viral e bacteriana, nos quais eritrócitos humanos tornam-se aglutináveis por anticorpos normalmente presentes no soro de indivíduos adultos (Lis & Sharon, 1998).

As lectinas possuem várias aplicações também na área da medicina, sendo promissoras no campo da imunologia, uma vez que estimulam a mitogênese de linfócitos (Sharon & Lis, 2004). Muitas dessas proteínas possuem, ainda, a capacidade de aglutinar e identificar células malignas e reduzir o potencial tumoral nas células cancerosas (Singh et al., 2004).

Algumas lectinas de plantas já estão sendo empregadas no diagnóstico e na terapêutica do câncer. Como exemplos podem ser citadas a lectina de *Agaricus bisporus* (*champignon*), utilizada na inibição de proliferação de células tumorais em câncer de cólon e a aglutinina de *Helix pomatia*, que vem sendo utilizada na identificação de tumores (Parslew et al., 1999).

A habilidade das lectinas de plantas para interagirem com carboidratos expostos na superfície de bactérias e fungos impede o desenvolvimento destes microrganismos. Além disso, essa propriedade tem possibilitado o uso dessas proteínas como ferramenta na identificação de bactérias patogênicas (Grahamstown & Van Staden, 2002). A lectina de folha de *Morus alba* causou a aglutinação da bactéria fitopatogênica *Pseudomonas syringae* pv *mori* (Ratanapo et al., 2001).

Ciopruga et al. (1999) estudaram o efeito da aglutinina de germe de trigo sobre *Fusarium graminearum* e *Fusarium oxysporum* e mostraram que a ligação dessa lectina à parede celular dos fungos afetou o compartimento interno e o crescimento dos germes, o que pôde ser comprovado pelas mudanças drásticas na morfologia dos fungos, tais como a lise das hifas e o extravasamento do conteúdo celular.

As lectinas podem também 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 ação fungicida, antimicrobiana e inseticida das lectinas torna viável o uso dessas proteínas como agentes defensivos de pragas na agricultura.

2.3 Fungos fitopatogênicos

Os fungos são organismos eucarióticos e, em sua maioria, filamentosos, que ocorrem no solo como células ou estruturas de repouso (esporos), como hifas (filamentos microscópicos) ou micélio (conjunto de hifas). Não possuem clorofila, sendo, portanto, heterotróficos, e obtêm energia de compostos orgânicos. Embora não sejam predominantes, em termos numéricos, representam 70%-80% da biomassa microbiana da maioria dos solos. Sua ocorrência está diretamente relacionada ao teor de matéria orgânica, sendo também influenciada pelo pH e umidade do solo. Predominam em solos ricos em matéria orgânica e com pH na faixa ácida. Milhares de espécies, pertencentes a todas as classes, já foram isoladas do solo, sendo a maioria pertencente à classe Deuteromycetes. Os fungos mais representativos do solo são espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phytium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Phycomyces*, *Verticillium*, *Pilobulus*, *Humicola*, *Gaeumannomyces* e *Chaetomium* (Siqueira & Franco, 1988).

A parede celular dos fungos é altamente versátil, sendo continuamente expandida durante o crescimento e extensivamente remodelada durante o desenvolvimento. Quimicamente, a parede contém de 80% a 90% de polissacarídeos, sendo o restante constituído de proteínas e lipídeos. Em algumas espécies, são encontradas quantidades apreciáveis de pigmentos (melanina), polifosfatos e íons inorgânicos.

Fisicamente, a parede celular é formada por microfibrilas entrelaçadas, embebida numa matriz amorfa. Quitina e celulose são os principais componentes microfibrilantes da maioria dos fungos filamentosos, enquanto que, nas leveduras ou fungos unicelulares, a parede contém, principalmente, glicanas não celulósicas. Proteínas e vários polissacarídeos (glicanas, mananas, galactanas e

heteropolissacarídeos) são as principais substâncias cimentantes. Os monossacarídeos mais freqüentemente encontrados na parede celular dos fungos são: D-glicose, N-acetil-D-glicosamina, D-manose, D-galactose, D-galactosamina, L-fucose, D-glicosamina, D-xilose e ácido D-glicurônico. Desses, glicose, N-acetil-D-glicosamina e manose são encontrados na maioria dos fungos. Ocasionalmente, ramnose, ribose e arabinose podem ser observadas (Bartinicki-Garcia, 1968).

Os fungos exercem papel de grande relevância nos diferentes ecossistemas que integram. A principal função desses microrganismos resulta da sua atividade heterotrófica sobre restos vegetais depositados no solo e a formação de relações simbióticas, mutualistas (micorrizas) e parasíticas (doenças) com as plantas. São importantes agentes de controle biológico de outros fungos e nematóides fitopatogênicos (Boleti, 2003).

Do ponto de vista humano, os fungos podem ter um lado positivo e outro negativo. Positivamente, são utilizados na indústria, na medicina e na alimentação, entre outras áreas. Por outro lado, são maléficos, podendo causar doenças em homens e animais. Além disso, são os principais causadores de doenças em plantas, acarretando sérios prejuízos na agricultura mundial (Bergamim Filho et al., 1995).

2.3.1 Atividade fungicida das lectinas de plantas

Uma vez que as lectinas de plantas não podem penetrar no citoplasma das células de fungos, devido à presença de uma compacta e rígida parede celular, uma interferência no crescimento e no desenvolvimento desses organismos (alterações na estrutura e nos processos intracelulares) parece improvável. Entretanto, efeitos indiretos, baseados na ligação das lectinas a carboidratos expostos na superfície da parede celular dos fungos, são possíveis (Peumans & Van Damme, 1995).

Existem vários relatos, na literatura, de lectinas que apresentaram efeitos inibitórios no crescimento de fungos: lectinas de folha de *Ginkgo biloba*, (conhecida como Ginkgo) inibiu o crescimento das hifas de *Pellicularia sasakii* Ito (Huang et al., 2000); lectina de *Talisia esculenta* (conhecida como pitomba) inibiu o crescimento dos fungos em 280 µg, quando foram incubadas na presença de *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* (Freire et al., 2002); lectina de *Pouteria torta* (conhecida como curriola) inibiu o crescimento de *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum musae* (Boleti, 2003).

2.3.2 *Fusarium oxysporum*

Visto que a atividade fungicida da lectina de folha de mandioca será avaliada sobre o fungo *Fusarium oxysporum*, segue uma breve descrição dele.

Os fungos *Fusarium oxysporum* pertencem ao reino Fungi, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae* e gênero *Fusarium*. Sua fase teleomórfica (sexual) pertence à ordem *Hypocreales* e gênero *Nectria* (Lacazet al., 1998).

De acordo com Guarro & Gene (1992), as culturas de *Fusarium* spp são caracterizadas pelo crescimento rápido da colônia, com micélio aveludado e levemente cotonoso, opaco ou discretamente brilhante. Após sete a dez dias de incubação, a 25°C, o fungo pode apresentar características de pigmentação do micélio de cor rosa, púrpura, cinza ou amarela, sendo essas características importantes para a identificação das espécies.

Podem causar diversas doenças graves no sistema radicular de plantas, como tombamento, podridão de raízes e murchas, podendo, algumas espécies, produzir poderosas toxinas (Kpfeffer, 1999). Esse fungo tem alta capacidade de sobrevivência, havendo relatos de sua permanência no solo por mais de 20 anos, na ausência do hospedeiro (Stover, 1972).

Um exemplo típico de prejuízo causado especificamente pelo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* é o mal-do-panamá em bananeiras, também conhecido como fusariose ou murcha-de-fusarium (Pereira et al., 1999). A espécie *Fusarium oxysporum* produz doenças também em tomate, batata-doce, pêra, ataca as folhas de cana-de-açúcar, café e feijão.

A busca por produtos naturais, que possam ser usados como agentes potencialmente úteis ao combate de pragas e patógenos que causam prejuízos a culturas socioeconômicas importantes, contribui para amenizar o problema do uso de inseticidas e fungicidas sintéticos, utilizados no combate de pragas e doenças. Além de serem onerosos para a maioria das colheitas, esses produtos resultam em contaminação ambiental e induzem o surgimento de espécies resistentes (Macedo et al., 2000).

Diante disso e dos prejuízos gerados à agricultura mundial pela ação dos fungos da espécie *Fusarium oxysporum*, além do característico crescimento rápido de sua colônia, a lectina da folha de mandioca será avaliada quanto à capacidade inibitória sobre essa espécie fúngica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido nos departamentos de Química (DQI), Biologia (DBI - Setor de Fisiologia Vegetal e Biologia Molecular) e de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.1 Material biológico e reagentes

A cultura do fungo *Fusarium oxysporum* foi obtida da micoteca do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

Os reagentes usados para eletroforese foram: acrilamida, metilenobisacrilamida, TEMED, SDS, Coomassie R-250 e os padrões de massa molecular foram de marca Sigma e o persulfato de amônio da Merck.

O tubo para diálise e o corante Coomassie Blue G-250, utilizado na determinação de proteínas, foram da marca Sigma.

Os demais reagentes foram de grau analítico de marcas variadas.

3.2 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 DQI/UFLA. 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.

3.3 Métodos de extração das proteínas

Para escolher o método de extração das proteínas da farinha de folhas de mandioca (FFM) que proporcionasse maior quantidade de proteína e maior atividade hemaglutinante, foram testados dois extratores: água destilada e solução salina tamponada ($\text{NaCl } 0,15 \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato $\text{pH} = 7,4$).

A proporção de FFM e extrator foi de 1:20 (m/v), de acordo com Pereira (2007). A mistura foi colocada sob agitação mecânica por quatro tempos de 15, 60, 120 e 180 minutos, à temperatura ambiente. Depois, a suspensão foi filtrada em tecido de organza e centrifugada, a $8.000 \times g$, por 15 minutos, a 7°C e o sobrenadante recolhido.

O resíduo de cada tempo de extração obtido foi submetido a duas reextrações sucessivas nas mesmas condições e os sobrenadantes reunidos (extrato protéico) para a determinação do teor protéico e atividade hemaglutinante. O extrato protéico, antes de ser submetido à dosagem de proteínas, foi precipitado com solução de ácido perclórico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, na proporção 1:1, por um tempo de 15 minutos em banho de gelo e, depois, centrifugado, a $2.300 \times g$, por 10 minutos. Em seguida, o pellet foi ressuspensionado em solução de $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Esse procedimento foi adotado para remover possíveis interferentes presentes no extrato protéico.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com três repetições, compondo um esquema fatorial 2×4 , em que se avaliaram a utilização de dois extratores, água destilada e solução salina tamponada, e o tempo de extração (15, 60, 120 e 180 minutos). As variáveis analisadas foram rendimento protéico e atividade hemaglutinante no extrato protéico. Os resultados observados para o rendimento protéico foram submetidos à análise de variância. Para o estudo das médias, foram realizados o teste de Tukey e a análise de regressão.

3.4 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas obtidas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Este método é baseado na interação entre o corante coomassie blue de proteínas, que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (Compton & Jones, 1985). A concentração de proteína foi avaliada utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

O rendimento protéico da extração das proteínas da FFM foi expresso em g 100g de FFM⁻¹.

3.5 Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante (AH) foi realizada segundo a metodologia descrita por Calderón de la Barca et al. (1985). A AH foi realizada em placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços cada, os quais foram preenchidos com 100µL de solução salina tamponada e, em seguida, acrescidos com igual volume de amostra nos primeiros poços da fileira. A amostra foi submetida a uma série de diluições na base 2 (2⁰, 2¹, 2², 2³, etc.), em triplicata, com homogeneização e transferência de 100µL para o poço seguinte até o penúltimo poço da fila.

Em seguida, a amostra diluída foi incubada com 100µL de suspensão de hemácias a 2%. A suspensão de eritrócitos foi preparada com 5mL de sangue humano tipo A Rh positivo, ao qual foram adicionados 250µL de solução de citrato de sódio 8%. A mistura foi lavada com solução salina tamponada (NaCl 0,15 mol L⁻¹, tampão fosfato pH 7,4) e centrifugada, a 1.620 x g, por 15 minutos à temperatura ambiente, até a obtenção de uma massa de eritrócitos íntegro, livre de soro e de material hemolisado. O sobrenadante obtido foi descartado e

o precipitado foi submetido à diluição em solução salina tamponada (NaCl 0,15 mol L⁻¹, tampão fosfato pH 7,4), obtendo-se uma solução de eritrócitos 2% (v/v).

Foram realizadas leituras da aglutinação das hemácias visualmente, após 60 e 90 minutos. 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⁻¹. Por exemplo: considerando uma diluição 2², o seu título igual a 1/4 e o volume de amostra utilizado no ensaio de 100μL, define-se que a atividade hemaglutinante será de 4 UH 100μL⁻¹. Os poços que continham somente a suspensão de eritrócitos serviram como controle.

3.6 Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante

O efeito da temperatura sobre a AH da lectina da FFM foi analisado utilizando alíquotas do extrato protéico da FFM (1mL), as quais foram submetidas a diferentes temperaturas: 40°, 60°, 70°, 80° e 90°C, por 30 minutos, em 3 repetições. Depois, foram resfriadas em banho de gelo e as alíquotas submetidas à dosagem de proteínas e ensaio de AH.

3.7 Efeito de cátions divalentes (Ca²⁺ e Mn²⁺) na atividade hemaglutinante

Para a verificação do efeito dos cátions Ca⁺² e Mn⁺² sobre a AH, o extrato protéico obtido da FFM foi dialisado contra EDTA 0,2mol L⁻¹, por 48 horas, com 3 trocas diárias, seguindo-se diálise contra NaCl 0,15mol L⁻¹, por 24 horas e usado para o ensaio da AH. Como controle utilizou-se o extrato protéico não-dialisado contra EDTA.

O efeito desses cátions divalentes na aglutinação de hemácias também foi avaliado isoladamente. Para isso, incubaram-se 100μL de uma suspensão de eritrócitos a 2%, com 100μL das seguintes soluções: solução salina 0,15mol L⁻¹,

contendo CaCl_2 nas concentrações de 1, 3 e 5mmol L^{-1} ; solução salina $0,15\text{mol L}^{-1}$, contendo MnCl_2 nas concentrações de 1, 3 e 5mmol L^{-1} e solução salina $0,15\text{mol L}^{-1}$, contendo CaCl_2 e MnCl_2 nas concentrações de 1, 3 e 5mmol L^{-1} . Como controle, utilizaram-se $100\mu\text{L}$ da suspensão de eritrócitos 2% e $100\mu\text{L}$ de solução salina. A aglutinação das hemácias foi avaliada após 60 minutos de incubação.

3.8 Precipitação das proteínas e diálise

O extrato protéico obtido de 25g de FFM, tendo como extrator a água (1:20, m/v) em um tempo de extração de 15 minutos, foi submetido à precipitação em 3 repetições

O sulfato de amônio foi usado como agente precipitante. Ao extrato protéico adicionou-se sulfato de amônio sólido, até atingir 80% de saturação (Pereira, 2007). Para atingir esta saturação, a quantidade de sulfato de amônio adicionada foi de $561\text{g}/1.000\text{mL}$ (Scopes, 1993). Durante a adição do sal, 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 $8.000 \times g$, por 15 minutos, a 7°C . O precipitado obtido foi redissolvido em solução $\text{NaCl } 0,15\text{mol L}^{-1}$ e dialisado extensivamente contra a mesma solução (tubo para diálise benzoilado 32 mm com limite de exclusão de 2 kDa, volumes de 2L de solução de $\text{NaCl } 0,15\text{mol L}^{-1}$, 3 trocas diárias, durante 72 horas, em geladeira e agitação magnética) para a retirada do sulfato de amônio. A suspensão obtida foi submetida à dosagem de proteínas e ao ensaio de AH.

3.9 Purificação parcial das proteínas

Uma coluna de vidro 2 x 40cm foi empacotada com a resina Sepharose CL-4B, de acordo com as instruções do fabricante. A coluna foi equilibrada com NaCl 0,15mol L⁻¹, até que a leitura em 280 nm permanecesse constante, com valores abaixo de 0,02. Em seguida, foi aplicado o volume de 30mL (5,84 mg de proteína) da suspensão (extrato protéico precipitado a 80% dialisado contra NaCl 0,15mol L⁻¹), em um fluxo constante de 1mL/min, com o auxílio de uma bomba peristáltica (Pharmacia Biotech). As corridas cromatográficas foram realizadas em geladeira, à temperatura de 4°C.

As proteínas não retidas foram eluídas com a mesma solução de equilíbrio e as proteínas com afinidade pela matriz estacionária foram eluídas com a solução de equilíbrio (NaCl 0,15mol L⁻¹) contendo galactose 0,1mol L⁻¹. O eluato foi continuamente recolhido em frações de 2,5mL, com o auxílio de coletor de frações e monitorado por espectrofotômetro, em 280 nm.

Posteriormente, a coluna foi lavada com 100mL de etanol 80%, para avaliar se todas as proteínas foram retiradas da coluna, e a solução de lavagem recolhida submetida à leitura em espectrofotômetro, a 280nm.

As frações do pico foram reunidas, as proteínas quantificadas e liofilizadas até peso constante. Para a solução obtida da lavagem da coluna com etanol 80%, realizou-se diálise (tubo para diálise benzoilado 32 mm com limite de exclusão de 2 kDa, volumes de 1L de água, 3 trocas diárias, durante 24 horas, em geladeira e agitação magnética). Em seguida, o material dialisado foi também liofilizado. Ambos os liofilizados foram submetidos ao ensaio de AH e, ainda, as frações do pico liofilizadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

No intuito de avaliar o grau de pureza das amostras protéicas, bem como obter uma estimativa da massa molecular da lectina, realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (PAGE-SDS), segundo o método descrito por Laemmli (1970).

O gel de separação da amostra foi feito em uma concentração de 12,5% (a uma proporção de acrilamida/bisacrilamida 37,5:1) e preparado em tampão tris/HCl 1,5mol L⁻¹, pH 8,8, contendo SDS 0,4%, TEMED (concentrado) e persulfato de amônio 10%. A concentração do gel superior ou de empilhamento foi de 6% e foi preparado em tampão tris/HCl 0,5mol L⁻¹, pH 6,8, contendo 0,4% de SDS, TEMED (concentrado) e persulfato de amônio 10%.

As amostras foram dissolvidas em tampão tris/HCl 62,5mmol L⁻¹, pH 6,8, contendo 10% de glicerol, 2% de SDS, 5% de 2-β-mercaptoetanol e 200mg de azul de bromofenol, sendo, em seguida, imersas em água de ebulição por cinco minutos.

Para a corrida eletroforética, foi utilizado o tampão glicina/tris-HCl 0,192 mol L⁻¹, 25mmol L⁻¹, pH 8,3, contendo 0,1% de SDS. A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de placas (*electrophoresis power supply* EPS 1001 - *Amersham pharmacia biotec*), a 60 volts, durante, aproximadamente, cinco horas. Como marcadores de massa molecular, foram utilizados: albumina sérica bovina (66kDa), ovoalbumina (45kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36kDa), anidrase carbônica (29kDa), tripsinogênio (24kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1kDa) e lactoalbumina (14,2kDa).

Os géis, depois de retirados das placas, foram corados com Comassie Blue R-250 (2,5mg mL⁻¹), etanol a 50% e ácido acético 10% em água, por 24 horas. As bandas protéicas foram descoradas após imersão do gel em uma solução descorante (ácido acético 10% e etanol 5% em água).

A distância percorrida pelos marcadores de massa molecular e pelas amostras foi calculada em centímetros e utilizada nos cálculos de regressão linear para estimar a massa molecular das amostras.

3.11 Avaliação da atividade fungicida

A amostra utilizada na avaliação da atividade fungicida foi obtida conforme descrito no item 3.8 (Material e métodos), exceto que o precipitado protéico foi redissolvido em água e dialisado contra a mesma. Após a diálise, a suspensão foi submetida à liofilização até peso constante.

O liofilizado nas concentrações de 100, 50, 10 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi, então, incorporado ao meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar) previamente esterilizado e fundido à temperatura de 45°–50°C. O tratamento controle continha apenas BDA puro.

Em placas de Petri de 9cm de diâmetro, previamente esterilizadas em forno específico por 90 minutos, foram adicionados, aproximadamente, 25 mL de meio de cultura na concentração de amostra correspondente, em 4 repetições. Após a solidificação, discos de, aproximadamente, 9mm de diâmetros contendo micélios do fungo *Fusarium oxysporum* (retirados de colônia com 6 dias em BDA) foram repicados para o centro das placas, as quais foram vedadas com filme plástico e colocadas em incubadora com “biological oxygen demand” (BOD), a 25°C .

A medição do crescimento micelial da cultura de *Fusarium oxysporum* foi realizada no sétimo dia após a inoculação dos fungos. Para tal, foram traçadas duas retas pela placa de Petri, passando pelo centro do disco de 9mm, uma perpendicular à outra. As leituras foram realizadas pela medição do diâmetro de crescimento das colônias (médias de duas medidas diametralmente opostas) (Balbi-Peña et al., 2006). A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada para cada dosagem em relação ao controle.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com quatro repetições, em que se avaliaram cinco tratamentos (quatro concentrações da amostra e um controle). A variável analisada foi o crescimento micelial da cultura de fungos, e os resultados foram submetidos à análise de variância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Métodos de extração das proteínas

A análise de variância para o rendimento protéico de extração mostrou efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) para o tempo e para o extrator, havendo também interação significativa entre esses dois fatores (Tabela 1 A do Anexo). Diante deste resultado, fez-se o desdobramento de tempo dentro de cada extrator e, em seguida, foi feito o desdobramento do extrator dentro de cada tempo.

A análise de regressão detectou aumento linear no rendimento protéico com o aumento do tempo de extração, quando o extrator utilizado foi a solução salina. No entanto, quando o extrator utilizado foi a água destilada, houve um decréscimo do rendimento protéico em um intervalo de extração compreendido entre 15 e, aproximadamente, 79 minutos. A partir deste ponto, o rendimento começou a aumentar com o aumento do tempo de extração (Figura 1).

Na Tabela 2 são apresentados os rendimentos médios da extração das proteínas, considerando-se os extratores utilizados. Para o tempo de extração de quinze minutos, não houve diferença significativa entre os dois extratores utilizados. Para os demais tempos de extração, a solução salina proporcionou maior extratibilidade protéica, o que está intimamente ligado ao aumento da força iônica do meio, e o conseqüente aumento da solubilidade das proteínas.

As atividades hemaglutinantes obtidas para cada método de extração estão apresentadas na Tabela 3. A água destilada com um tempo de extração de 15 minutos apresentou maior atividade hemaglutinante (AH). Observou-se que, com o aumento do tempo de extração, houve um decréscimo da atividade. Isso ocorreu, provavelmente, porque, com tempos maiores de extração, as proteínas da FFM ficam por tempo relativamente maior sob agitação constante, o que pode contribuir para a desnaturação das proteínas, levando a alterações em sua

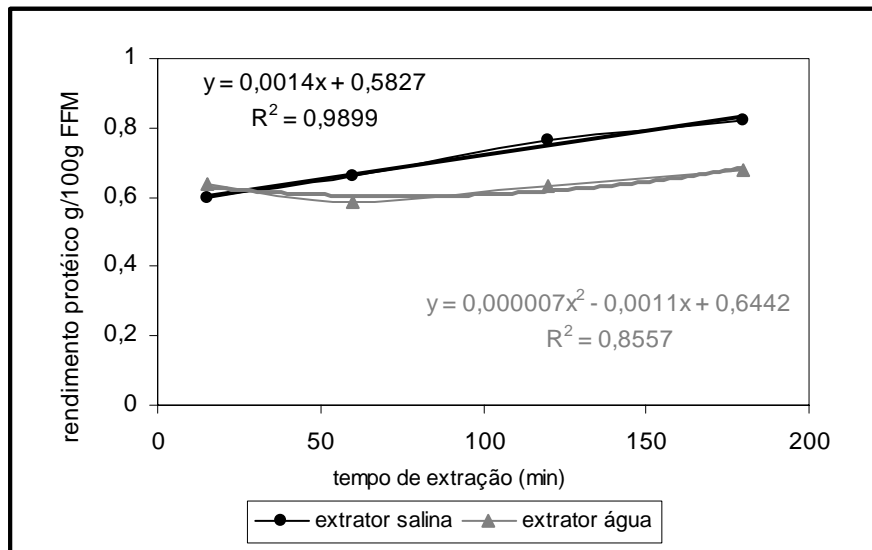


FIGURA 1 Curvas e equações de regressão representativas dos valores de rendimento protéico de dois extratores, em função do tempo de extração. UFLA/DQI, Lavras, MG, 2008.

TABELA 2 Rendimentos médios de proteína ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) da farinha de folhas de mandioca. UFLA/DQI, Lavras, MG, 2008.

Extrator	Tempo de extração (minutos)			
	15	60	120	180
Água destilada	0,64 a	0,59 a	0,63 a	0,68 a
Solução salina*	0,60 a	0,66 b	0,76 b	0,82 b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

*Solução de $\text{NaCl } 0,15\text{mol L}^{-1}$ com tampão fosfato pH 7,4.

conformação protéica, resultando no decréscimo ou, até mesmo, na perda da sua atividade.

TABELA 3 Atividade hemaglutinante com dois extratores e vários tempos de extração. UFLA/DQI. Lavras, MG, 2008.

Tempo (minutos)	Extrator	Proteína ($\mu\text{g}/100\mu\text{L}$)	Atividade hemaglutinante	
			(UH ^b /100 μL)	Atividade específica (UH/mg proteína)
15	Água destilada	10,67	8	749,8
	Solução salina ^a	10,00	4	400,0
60	Água destilada	9,83	4	406,92
	Solução salina	11,00	ND ^c	-
120	Água destilada	10,50	2	190,48
	Solução salina	12,67	ND	-
180	Água destilada	11,33	1	88,26
	Solução salina	13,67	ND	-

^a NaCl 0,15mol L⁻¹ com tampão fosfato pH 7,4.

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

^c Não detectada.

Assim, optou-se por extrair as proteínas da FFM, utilizando-se água destilada como extrator, com o tempo de 15 minutos, uma vez que esta metodologia, embora não represente aquela de maior rendimento protéico, proporcionou a maior AH.

O estudo da atividade hemaglutinante no extrato bruto foi válido também para confirmar a presença de lectina na FFM, o que já havia sido observado por alguns pesquisadores (Melo et al., 2007; Pereira, 2007; Wobeto et al., 2007).

4.2 Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante

O efeito da temperatura na AH da lectina da FFM, avaliado em diferentes temperaturas, é mostrado na Figura 2.

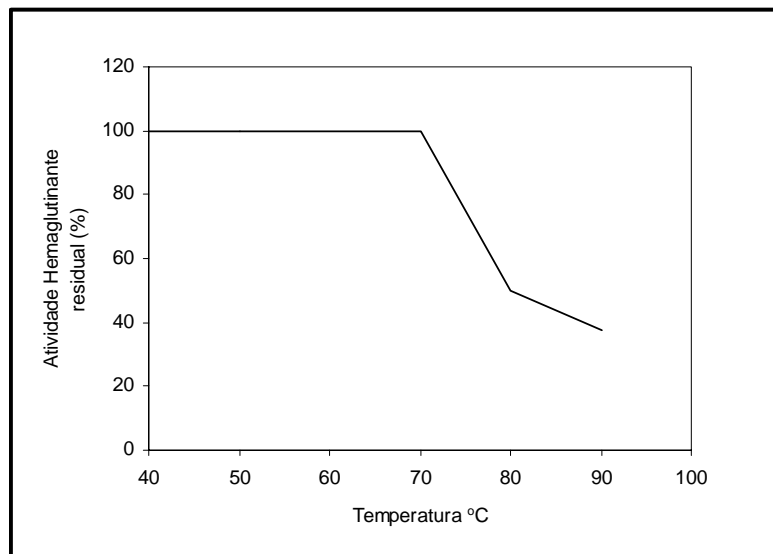


FIGURA 2 Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante da lectina da farinha de folhas de mandioca. Atividade hemaglutinante determinada após 30 minutos de incubação, nas referidas temperaturas. UFLA/DQI, Lavras, MG, 2008.

A lectina da FFM teve sua AH estável na faixa de temperatura de 40° a 70°C, após 30 minutos de exposição. Observou-se um decréscimo de 50% e 62,5% na atividade nas temperaturas de 80° e 90 °C, respectivamente. Esses resultados são compatíveis com algumas lectinas de plantas, como a de sementes de *Erythrina speciosa* (Corticeira), que teve a sua atividade hemaglutinante estável até 65°C (Konozy et al., 2003), a de sementes de *Bauhinia pentandra* (Silva, Horta & Moreira, 2001) e a de *Talisia esculenta* (Freire et al., 2002), que

não apresentaram diminuição significativa da atividade hemaglutinante até a temperatura de 70°C.

A acentuada estabilidade em amplas faixas de temperatura é uma característica de lectinas de plantas e está diretamente envolvida com o mecanismo de defesa que estas substâncias desempenham nos vegetais (Peumans et al., 1995).

4.3 Efeito de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) na atividade hemaglutinante

Algumas lectinas requerem, para sua AH, a presença de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} , para estabilizar os sítios de ligação dos açúcares (Weis & Drickamer, 1996). A fim de verificar se a lectina da FFM requer, para a sua atividade, estes íons, o extrato protéico da FFM foi submetido à diálise contra EDTA (quelante de metais) e apresentou AH. Os valores encontrados em 100µL do extrato não-dialisado e dialisado foram 4UH e 2UH, respectivamente. Esse decréscimo da AH no extrato protéico dialisado pode ser atribuído ao aumento de volume do extrato que ocorreu após a diálise, resultando em sua diluição. Ou, ainda, à própria remoção de íons que poderiam estar superestimando a aglutinação (Tabela 4). Este resultado sugere que a lectina da folha de mandioca parece não ser dependente dos cátions divalentes Ca^{2+} e Mn^{2+} para exercer sua AH.

A lectina de sementes de *Pouteria torta* (Boleti, 2003), quando incubada com ácido EDTA 0,025mol L⁻¹ e ácido EGTA 0,025mol L⁻¹, mostrou perda da atividade biológica, demonstrando ser dependente de íons Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} . No entanto, quando Ca^{2+} (12,5mmol L⁻¹) e Mn^{2+} (12,5mmol L⁻¹) foram adicionados ao ensaio de hemaglutinação, a atividade da lectina de *Pouteria torta* foi restaurada.

Resultado semelhante pode ser observado para a lectina da esponja marinha *Tedania ignis* (Dias, 2006), cuja atividade hemaglutinante no extrato

TABELA 4 Aglutinação de hemácias incubadas com soluções salinas contendo diferentes concentrações de Ca^{2+} e Mn^{2+} e da mistura de ambos os íons, na ausência de lectina. UFLA/DQI, Lavras, MG, 2008.

Soluções de NaCl $0,15\text{mol L}^{-1}$	Aglutinação de hemácias
contendo Ca^{2+}	
1mmol L^{-1}	negativo
3mmol L^{-1}	negativo
5mmol L^{-1}	positivo
contendo Mn^{2+}	
1mmol L^{-1}	positivo
3mmol L^{-1}	positivo
5mmol L^{-1}	positivo
contendo Ca^{2+} e Mn^{2+}	
1mmol L^{-1}	positivo
3mmol L^{-1}	positivo
5mmol L^{-1}	positivo

bruto só foi detectada após a adição dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} , na concentração de 25mmol L^{-1} .

O mecanismo de ação destes íons na atividade hemaglutinante de algumas lectinas de plantas é ainda desconhecido. Sabe-se somente que eles estão associados a uma série de aminoácidos que participam da ligação ao carboidrato (Moreira et al., 1991, Murdock et al., 2002). Todavia, segundo Rüdiger (1998), cátions divalentes em altas concentrações são capazes de aglutinar células e, para garantir que a aglutinação está sendo mediada pela lectina, exige-se que ocorra a inibição dessa atividade com a adição de carboidratos.

Por isso, a influência de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} , isoladamente, na aglutinação de hemácias foi analisada e os resultados apresentados na Tabela 4. Verifica-se que, em todas as soluções salinas incubadas com uma suspensão de hemácias, a 2%, houve aglutinação destas células, exceto naquelas contendo 1 e 3mmol L^{-1} de Ca^{2+} . Esse resultado confirma que os cátions Ca^{2+} e Mn^{2+} parecem exercer papel hemaglutinante e, quando adicionados ao ensaio de hemaglutinação, podem superestimar o valor desta atividade.

Diante dos resultados, torna-se necessária uma investigação mais detalhada sobre a real influência de cátions divalentes na atividade hemaglutinante de lectinas.

4.4 Precipitação das proteínas e diálise

A dosagem de proteínas e a AH determinadas no extrato protéico e no extrato protéico precipitado com sulfato de amônio 80% estão apresentadas na Tabela 5. Observa-se que, após a precipitação das proteínas com sulfato de amônio, a recuperação protéica foi de, aproximadamente, 58%.

TABELA 5 Proteína total e atividade hemaglutinante no extrato protéico e no precipitado com sulfato de amônio a 80%. UFLA/DQI, Lavras, MG, 2008.

Amostra	Proteína total (mg)	Atividade hemaglutinante ($\text{UH}^c \text{mg proteína}^{-1}$)
Extrato protéico ^a	$41,58 \pm 5,42$	$2.164,00 \pm 386,00$
Precipitado 80% ^b	$24,05 \pm 3,21$	$2.856,00 \pm 430,00$

^a O extrato protéico foi obtido de 25g de farinha de folhas de mandioca.

^b Extrato protéico precipitado com sulfato de amônio a 80%.

^c Inverso do título da maior diluição na base 2, em número de unidades hemaglutinantes (UH).

Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão.

Pereira (2007), trabalhando também com a proteína da FFM, obteve uma recuperação de 11%. Essa diferença na recuperação se deve, provavelmente, ao método de extração e precipitação das proteínas que diferiu em alguns aspectos, entre eles a membrana de diálise empregada. Em testes preliminares, a diálise das proteínas precipitadas foi feita com a mesma membrana utilizada por Pereira (membrana de celulose, 25mm com limite de exclusão de 12kDa). Nestes testes, a recuperação obtida foi de 20,5%. Contudo, ao substituir a membrana de diálise por outra de limite de exclusão de 2kDa, a recuperação teve um acréscimo significativo, visto que, com a membrana utilizada anteriormente, proteínas com peso molecular inferior a 12,5kDa estavam, provavelmente, sendo excluídas juntamente com o sulfato de amônio e outras moléculas de baixo peso molecular.

4.5 Purificação parcial das proteínas

Na Figura 3 está representado o perfil cromatográfico da amostra em coluna Sepharose CL-4B. O perfil mostra apenas um pico compreendido, aproximadamente, entre as frações 24 e 51, obtido a partir da eluição das proteínas não-ligadas à coluna. O perfil de eluição se repetiu a cada corrida cromatográfica realizada.

A resina Sepharose CL-4B (gel de agarose) foi utilizada como um ligante para proteínas com afinidade por polissacarídeos. Este tipo de metodologia já foi usado anteriormente por alguns pesquisadores que utilizaram essa matriz como ligante para purificar lectinas (Dias, 2006; Silva, Horta & Moreira, 2001).

Neste tipo de cromatografia (por bioafinidade), a eluição do material retido pode ser feita empregando-se o próprio ligante. Nesse caso, haverá uma competição entre o ligante unido à matriz e o ligante em solução (galactose) pela substância alvo (lectina), promovendo a sua eluição (Collins et al., 1997).

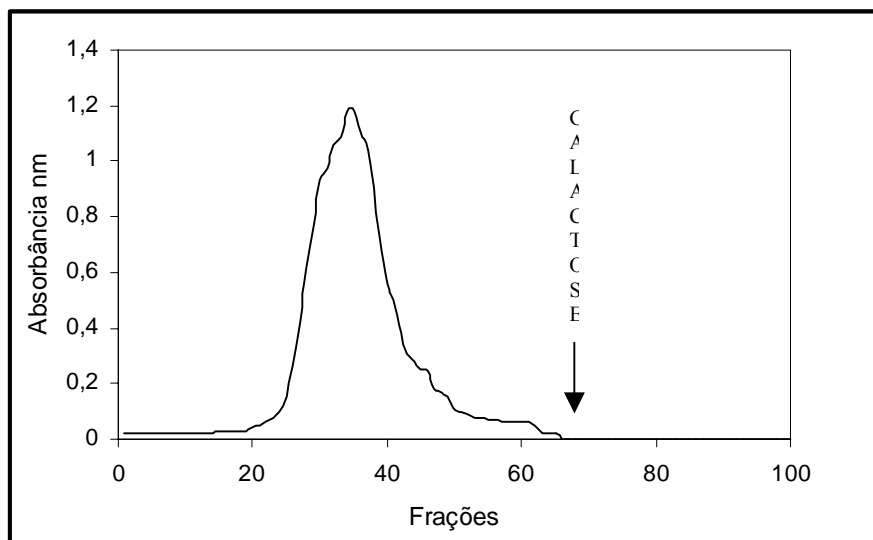


FIGURA 3 Perfil cromatográfico do precipitado protéico da farinha de folhas de mandioca. UFLA/DQI, Lavras, MG, 2008.

Coluna Sepharose 4B - CL: 2mm x 200mm, volume aproximado de 63mL. Frações de 2,5mL foram coletadas sob um fluxo constante de 1mL/minuto e lidas em espectrofotômetro em 280 nm. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com NaCl 0,15mol L⁻¹ para a eluição das proteínas não ligadas. As proteínas retidas na coluna foram eluídas com a mesma solução contendo galactose 0,1mol L⁻¹.

No caso da lectina da folha de mandioca, nenhum pico foi detectado após a aplicação da solução contendo o ligante (galactose).

A formação do complexo lectina-galactose pode ocorrer de forma específica por meio da ligação do açúcar com o sítio receptor de carboidratos presente na molécula da lectina ou, de forma não específica, na qual a interação das proteínas com o ligante envolve ligações fracas, como interações iônicas e hidrofóbicas ou ligações de hidrogênio.

Diante dos resultados, duas hipóteses foram levantadas quanto à interação da lectina com a matriz estacionária da coluna: 1) o sítio de ligação ao carboidrato da lectina da FFM não apresenta especificidade pelo ligante (galactose); nesse caso, a interação ocorre de forma não específica e a eluição com a solução salina ($\text{NaCl } 0,15\text{mol L}^{-1}$) foi suficiente para romper as ligações fracas entre a proteína e o ligante da coluna; 2) as proteínas foram separadas em função da massa molecular, visto que o gel de agarose (fase estacionária) é constituído de ligações intercruzadas, que fornecem poros, nos quais as proteínas de peso molecular elevado emergem da coluna mais cedo que as proteínas de baixo peso molecular, ocorrendo, assim, a separação.

Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante por galactose devem ser realizados, a fim de esclarecer as hipóteses aqui levantadas.

A concentração de proteína total do pico foi de 1,75mg, o que corresponde a uma recuperação de apenas 29,91%, haja vista que foram aplicados na coluna 5,84 mg de proteína.

Diante da baixa recuperação, a coluna foi lavada com uma solução de etanol 80%, a fim de remover proteínas que pudessem estar ainda retidas na coluna. A solução de lavagem foi recolhida e submetida à leitura em espectrofotômetro a 280nm, obtendo-se uma leitura de 1,00, sugerindo, assim, a presença de proteína na solução.

A atividade hemaglutinante foi detectada apenas no pico da coluna, com título de hemaglutinação igual a 0,5UH.

4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

O perfil eletroforético das etapas de purificação da lectina da folha de mandioca está representado na Figura 4.

O pico com atividade hemaglutinante (pista 2) apresentou três bandas protéicas, com pesos moleculares aparentes de 64, 61 e 58 kDa. Pesos

moleculares obtidos de lectinas vegetais são muito variáveis, como, por exemplo, da *Urtica dióica* (Broekaert et al., 1989), com peso molecular de 8,5kDa e *Phaseolus lunatus* (Moreira et al., 1991), com peso molecular de 265kDa.

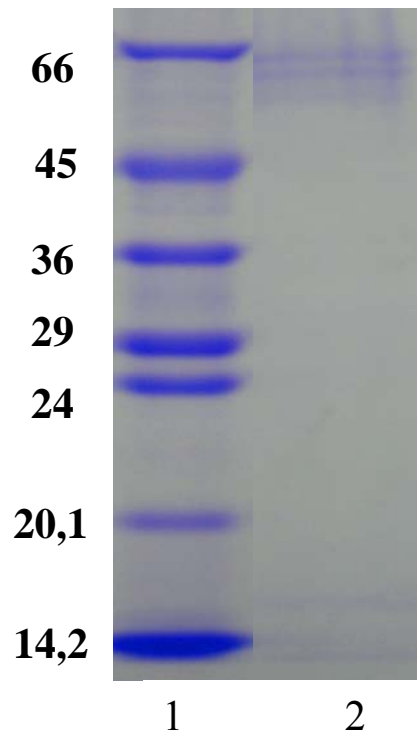


FIGURA 4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), com SDS das frações de purificação da lectina da farinha de folhas de mandioca. Marcadores de massa molecular (pista 1): albumina sérica bovina (66kDa), ovoalbumina (45kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36kDa), anidrase carbônica (29kDa), tripsinogênio (24kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1kDa) e lactoalbumina (14,2kDa); pico não retido proveniente da coluna Sepharose CL-4B (pista 2). UFLA/DQI. Lavras, MG, 2008.

4.7 Avaliação da atividade fungicida

Os resultados dos bioensaios realizados com o extrato protéico da FFM precipitado com sulfato de amônio a 80%, sobre o fungo *Fusarium oxysporum* estão ilustrados na Figura 5 e os dados do crescimento micelial estão apresentados na Figura 6.

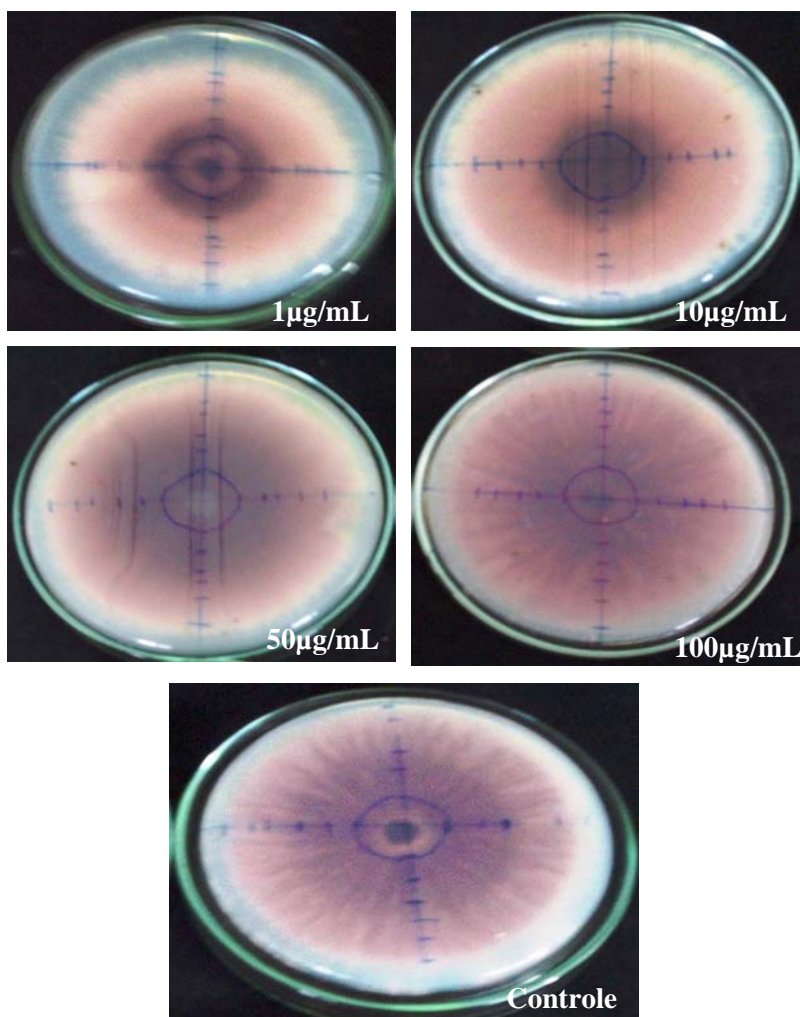


FIGURA 5 Bioensaio realizado com o extrato protéico da FFM precipitado com sulfato de amônio a 80%, sobre o crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum*. UFLA/DQI, Lavras, MG, 2008.

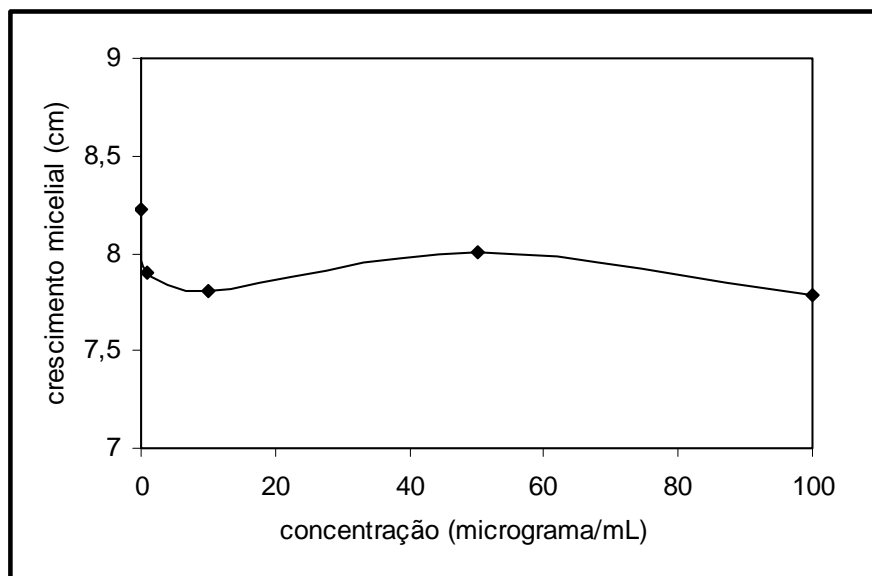


FIGURA 6 Efeito do extrato protéico da FFM precipitado com sulfato de amônio a 80% sobre o crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum*. UFLA/DQI, Lavras, MG, 2008.

A análise de variância para o crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* não foi significativa (Tabela 2A do Anexo). Isso indica que, nas concentrações utilizadas, 100, 50, 10 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não houve atividade inibitória da lectina da FFM sobre o crescimento desse fungo.

Não existem informações, na literatura, sobre o efeito fungitóxico da lectina da FFM sobre o *Fusarium oxysporum*. No entanto, existem relatos de lectinas vegetais com ação fungicida sobre essa espécie, como a lectina de *Talisia esculenta*, na concentração de 280 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Freire et al., 2002) e lectina de *Pouteria torta* na mesma concentração (Boleti, 2003).

Diante disso, novos ensaios, com concentrações mais elevadas, devem ser realizados, para confirmar ou não os resultados aqui obtidos.

5 CONCLUSÕES

A metodologia mais adequada para a extração das proteínas da FFM é a utilização de água destilada como extrator, na proporção 1:20 (m/v), em um tempo de 15 minutos, por ter apresentado maior atividade hemaglutinante.

A lectina da FFM é estável em ampla faixa de temperatura (40°-70°C), por 30 minutos, e não depende de íons metálicos, como Ca^{2+} e Mn^{2+} , para exercer sua atividade hemaglutinante.

Os cátions Ca^{2+} (5mmol L⁻¹), Mn^{2+} (1, 3 e 5mmol L⁻¹) e a mistura de ambos (1, 3 e 5mmol L⁻¹), quando adicionados ao ensaio de hemaglutinação, provocam a aglutinação de hemácias.

Na purificação das proteínas da FFM, obteve-se apenas um pico, no qual foi detectada atividade hemaglutinante. O pico ativo da coluna apresentou 3 bandas protéicas de 64, 61 e 58 kDa, respectivamente.

O extrato protéico da FFM precipitado com sulfato de amônio a 80% não afetou o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* nas concentrações utilizadas no bioensaio, sendo a concentração máxima utilizada de 100µg mL⁻¹.

6 PERSPECTIVAS

Como sugestões para futuros trabalhos, sugerem-se:

- . realizar ensaios de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares, a fim de determinar a especificidade da lectina da FFM, e aperfeiçoar a metodologia de purificação empregada;

- . caracterizar a lectina da FFM quanto à composição e seqüência em aminoácidos;

- . realizar novos ensaios com o extrato protéico da FFM precipitado com sulfato de amônio a 80% sobre o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum*, utilizando concentrações mais elevadas e realizar também o ensaio para outros fungos fitopatogênicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, V. B. M.; ALENCAR, M. N. N.; ASSREUY, A. M. S.; MOTA, M. L.; BRITO, G. A. C.; ARAGÃO, K. S.; BITTENCOURT, F. S.; PINTO, V. P. T.; DEBRAY, M.; RIBEIRO, R. A.; CAVADA, B. S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 37, n. 9, p. 1805-1814, 2005.

ALONSO, R.; RUBIO, L. A.; MUNIZ, M.; MARZO, F. The effect of extrusion cooking on mineral bioavailability in pea and kidney bean seeds meal. **Animal Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 94, n. 1-2, p. 1-13, 2001.

AWOYINGA, F.; ABEGUNDE, V.; ADEWUSI, S.R. Nutrient content of young cassava leaves and assessment of their acceptance as a green vegetable in Nigeria. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 47, n. 1, p. 21-28, 1995.

BALBI-PEÑA, M.I; BECKER, A.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; LOPES, M. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e Curcumina – I. avaliação in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 310-314, maio/junho 2006.

BARTINICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Annual Review Microbiology**., v. 22, p. 87-107, 1968.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, 919 p.

BOEHLMANN, H.; CLAUSEN, S.; BEHNKE, S.; GISE, H.; HILLER, C.; REIHMANN-PHILIPP, V.; SCHRADER, G.; BARKHOLT, V.; APEL, K. Leaf specific thionins of barley: a novel class of wall protein toxic to plant pathogenic fungi and possibly involved in the defense mechanisms of plants. **Embo Journal**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 1559-1565, 1988.

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.

BOURNE, Y.; ZAMBONI, V.; BARRE, A.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J.; ROUGE, P. *Helianthus tuberosus* lectin reveals a wild spread scaffold for mannosebinding lectins. **Structure with Folding & Design**, London, v. 7, n. 12, p. 1473-1482, Dec. 1999.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, London, v. 119, n. 3091, p. 419, 1954.

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

BROEKAERT, W. F.; ARIEN, W.; TERRAS, F. R. G.; DE BOLLE, M. F. C.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; DILLEN, L.; CLAEYES, M.; REES, S. B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. A. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. **Biochemistry**, Washington, v. 37, n. 17, p. 4308-4314, Sept. 1992.

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**, London, v. 245, n. 4922, p.1100-1102, 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.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting *proteus*: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of Diocleinae Subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**, Hil versum, v. 2, n. 2, p. 123-135, 2001.

CEREDA, M. P. **Manejo, Uso e Tratamento de subprodutos da Industrialização da Mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. 320 p. (Série Culturas de Tuberosas amiláceas Latino Americanas; v. 4).

CIOPRAGA, J.; GOZIA, O.; TUDOR, R.; BREZUICA, L.; DOYLE, R. J., Fusarium sp. Growth inhibition by wheat germ agglutinin. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1428, n. 2/3, p. 424-432, 1999.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Unicamp, 1997, 279 p.

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.

CZAPLA, T.H. Plant lectins as insect control proteins in transgenic plants. In: CAROZZI, N.; KOZIEL, M. (Eds.). **Advances in insect control**. London: Taylor & Francis, 1997. Cap. 8, p.123-138.

DIAS, A. S. F. **Lectina da esponja marinha *Tedania ignis*: purificação, caracterização e interação com leishmanias**. 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

ETZLER, M.E. Plant lectins: molecular and biological aspects. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 36, p. 209-234, 1985.

FRAIFE FILHO, G. A. F.; BAHIA, J. J. S. **Mandioca**. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/Mandioca.htm>>. Acesso em: 15 jul. 2006.

FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; DE SIMONE, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, n.1, p. 61-68, 2002.

GABIUS, H. J.; ANDRE, S.; KALTNER, H.; SIEBERT, H. C. The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica Et Biophysica Acta – General Subjects**, Amsterdam, v. 1572, n. 2-3, p. 165-177, 2002.

GERLACH, D.; SCHLOTT, B.; ZHRINGER, U.; SCHMIDT, K. N- acetyl -D- galactosamine/N- acetyl-D-glucosamine recognizing lectin from the snail *Cepea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expressions in *E. coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 223-232, 2005.

GIDAMIS, A.B.; O'BRIEN, G.M.; POULTER, N.H. Cassava detoxification of traditional Tanzanian cassava foods. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 211-218, 1993.

GRAHAMSTOWN, M.; VAN STADEN, J. Lectin-like proteins from South African plant species used in traditional medicine. **South African Journal of Botany**, v. 68, n. 1, p. 36-40, 2002.

GUARRO, J.; GENE, J. Fusarium infections criteria for the identification of the responsible species. **Mycoses**, Berlin, v. 35, n. 5-6, p. 109-114, May/June 1992.

HUANG, X.; XIE, W. J.; GONG, Z. Z. Characteristics and antifungal activity of a chitin bindin protein from *Ginkgo biloba*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 478, n. 1-2, p.123-126, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.sectec.gov.br/links/institutos/ibge.htm>>. Acesso em: 05 jan. 2008.

JESUS, V. S.; MORAES, C. F.; TELES, F. F. F.; SEDIYAMA, C. S.; MORAES, G. H. K. de. Teor de proteína nas folhas de dez variedades de mandioca durante o primeiro ciclo de crescimento. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 34, n. 194, p. 366 -377, 1987.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica and Biophysica Acta. General Subjects**, Amsterdam, v. 1572, n. 2-3, p.187-197, 2002.

KONOZY, E. H. E., BERNARDES, E. S., ROSA, C., FACA, V., GREENE, L. J., WARD, R. J. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 410, n. 2, p. 222-229, 2003.

KPEFENNING, L. **Apostila SAN-548**. Lavras: UFLA, 1999.

LACAZ, C. S.; PORTO, C.; MARTINS, J. E. C. **Guia para identificação:** fungos Actinomicetos e Algas. São Paulo: Sarvier, 1998.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

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

LIENER, I. E. Phytohemagglutinins (phytolectins). **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 27, p. 291-319, 1976.

LIMA, V. L. M.; CORREIA, M. T. S.; CECHINEL, Y. M. N.; SAMPAIO, C. A. M.; OWEN, J. S.; COELHO, L. C. B. B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 27-32, 1997.

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

LYIMO, M. H.; NYAGWEGWE, S.; MINKENI, A. P. Investigations on the effect of traditional food processing, preservation and storage methods on vegetable nutrients: a case study in Tanzania. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 41, p. 53-57, 1991.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica Et Biophysica Acta – General Subjects**, Amsterdam, v. 1572, n. 2-3, p. 198-208, 2002.

LUTALADIO, N. B. Evaluation of cassava clones for leaf production in Zaire. In: TERRY, E. V. (Ed). **Tropical root crops: production and usus in Africa**, Ottawa: International Development Research Center, 1984. p. 41-44.

MACEDO, M. L. R.; COELHO, M. B., FREIRE, M. G. M., MACHADO, O. L. T., MARANGONI, S., NOVELLO, J. C. Effect of a toxin protein isolated from *Zea mays* seeds on the development and survival of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus*. **Protin and Peptide Letters**, Hilverson, v. 7, n. 4, p. 225-231, 2000.

MELO, D. S. de; CORREA, A. D.; MARCOS, F. C. A.; SOUSA, R. V. de; ABREU, C. M. P. de.; SANTOS, C. D. dos. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sanguíneo e o peso do fígado de ratos. **Ciência e Agrotecnologia.**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 420-428, mar./abr. 2007.

MILLAR, D. J.; ALLEN, A. K.; SMITH, G. C. Chitin-binding proteins in potato (*Solanum tuberosum*) tuber. Characterization, immunolocalization and effects of wounding. **Biochemical Journal**, London, v. 283, n. 3, p. 813-821, 1992.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; AINOZ, I. L. Plant lectins: chemical and biological aspects. In: CONGRESS ON PROTEINS OF THE BRAZILIAN, 1., 1990, São Paulo. **Proceeding**, São Paulo: COBRAP, 1990. v. 90, p. 73-96.

MURDOCK, L. L. and Shade, R.E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against Insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.**, Washington, v. 50, n. 22, p. 6605-6611, Nov. 2002.

NEVEL, V. C., RYCKE, H., BEECKMANS, S., WILDE, R., DRIESSCHE, E.V. Inhibitory action of spray dried blood plasma and whole egg powder on lectins in extracts of several legume seeds: a qualitative approach. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 319-326, Mar. 1998.

NI, Y.; TIZARD, I. Lectin – carbohydrate interaction in the immune system, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 55, n. 1-3, p. 205-223, 1996.

PARSLEW, R.; JONES, K. T.; RHODES, J. M.; SHARPE, G. R.; The antiproliferative effect of lectin from the edible mushroom (*Agaricus bisporus*) on human keratinocytes: preliminary studies on its use in psoriasis. **The British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 140, n. 1, p. 56-60, 1999.

PENTEADO, M. V. C.; FLORES, C. I. O Folhas de mandioca como fonte de nutrientes. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Culturas de tuberosas amiláceas latinoamericanas: manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargil, 2000. v. 4. Disponível em: <<http://www.abam.com.br/livroscargil/Capitulo%204/Capitulo%203.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2007.

PEREIRA, C. A. **Hemaglutinina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*): purificação parcial e toxicidade**. 2007. 43 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PEREIRA, L.V. et al. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 196, p. 37-47, 1999.

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.

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. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends Food Science Technology**, Cambridge, v. 7, n. 4, p. 132-138, 1996.

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.

RABIJNS, A.; VERBOVEN, C.; VAN DAMME, E. J.; PEUMANS, W. J.; DE RANTER, C. J. A legume in two crystal forms: preliminary diffraction analysis. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, Copenhagen, v. 56, n. 12, p. 1638-1640, 2000.

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

RÜDIGER, H. Plant lectins – more than just tools for glicoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica**, Basel, v. 161, n. 1-4, p. 130-152, 1998.

RÜDIGER, H.; SIELBERT, H.C.; SOLIS, D.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LIETH, C.W.; DIAZ-MAURIÑO, T.; GABIUS, H.J. Medicinal chemistry based on sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Current Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 7, n. 4, p. 389-416, 2000.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 426-429, 1990.

SANTOS, A. C. O.; PEIXOTO, C. A.; COELHO, L. C. B. B. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins. *Cratylia mollis* seeds. **Micron**, Oxford, v. 35, n. 7, p. 613-618, 2004.

SCOPES, R. K. **Protein Purification**. 3.ed. New York: Springer – Verlarg, 1993. 346 p.

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

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

SHARON, N.; LIS, H. Lectins. **Encyclopedia of life sciences**, 2001. p.1-9.

SHARON, N.; LIS, H. Legume Lectins: a large family of homologous proteins. **Faseb Journal**, Bethesda, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

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.

SILVA, M. R.; SILVA M. A. A. P. da. Fatores Antinutricionais: Inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 3-9, jan./abr. 2000.

SINGH, J.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S. A novel mitogenic and antiproliferative lectin from a wild cobra lily, *Arisaema flavum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 318, n. 1, p. 1057-1065, 2004.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo**: fundamentos e perspectivas. São Paulo: Nagy, 1988. 236 p.

STOEVA, S.; FRANZ, M.; WACKER, R.; KRAUSPENHAAR, R.; GUTHOHRLEIN, E.; MIKHAILOV, A.; BETZEL, C.; VOELTER, W. Primary structure, isoforms, and molecular modeling of a chitin-binding mistletoe lectin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 392, n. 1, p. 23-31, 2001.

STOVER, R. H. **Banana, plantain and abaca diseases**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1972. 316 p.

TINJUANGJUN, P. Snowdrop lectin gene in transgenic plants: its potential for Asian agriculture. **AgBiotechNet**, Wallingford, v. 4, p. 1-5, 2002.

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, Nov./Dec. 1998.

VAN DAMME, E. J. M.; ASTOUL, C. M.; BARRE, A.; ROUGE, P.; PEUMANS, W. J. Cloning and characterization of a monocot mannose binding lectin from *Crocus vernus* (family Iridaceae). **European Journal of Biochemistry / FEBS**, Oxford, v. 267, n. 16, p. 5067-5077, 2000a.

VAN DAMME, E. J. M.; HAO, Q.; CHARELS, D.; BARRE, A.; ROUGE, P.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. Characterization and molecular cloning of two different type 2 ribosome-inactivating proteins from the monocotyledonous plant *Polygonatum multiflorum*. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, Oxford, v. 267, n. 9, p. 2746-2759, 2000b.

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

VIZEU, V. E.; FEIJÓ, M. B. S.; CAMPOS, R. C. de. Determinação da composição mineral de diferentes formulações de multimistura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.2, p. 254-258, abr./jun. 2005.

WATKNIS, W. M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti – H agglutinin in cell by simple sugars. **Nature**, London, v. 169, n. 4307, p. 825-826, 1952.

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

WOBETO, C.; CORREA, A. D.; ABREU, C. M. P. de.; SANTOS, C. DOS.; PEREIRA, H. V. Antinutrients in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf powder at three ages of the plant. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p.108-112, Jan./Mar. 2007.

8 ANEXO

	Página
TABELA 1 A Resumo da análise de variância para o rendimento protéico das extrações.....	53
TABELA 2 A Resumo da análise de variância para o crescimento micelial do fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	53

TABELA 1 A Resumo da análise de variância para o rendimento protéico das extrações.

FV	GL	SQ	QM
Tempo	3	0,0727	0,0242**
Extrator	1	0,3682	0,0368**
Tempo*Extrator	3	0,0302	0,0101**
Erro	16	0,0176	0,0011
Coeficiente de variação (%)		4,93	
Média geral (%)		0,67	

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 2 A Resumo da análise de variância para o crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum*.

FV	GL	SQ	QM
Concentração	4	1,4992	0,3748 ^{ns}
Erro	15	2,2431	0,1495
Coeficiente de variação (%)		4,93	
Média geral (cm)		7,85	

^{ns} Não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.