

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
CURSO DE ZOOTECNIA

**EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LECTINAS
COM POSSÍVEL EFEITO ANTINUTRICIONAL DE LEGUMINOSAS UTILIZADAS
NA SUPLEMENTAÇÃO ANIMAL**

Aluno: Rafael Carvalho da Siva
Orientador: Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira

Chapadinha-MA

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
CURSO DE ZOOTECNIA

**EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LECTINAS
COM POSSÍVEL EFEITO ANTINUTRICIONAL DE LEGUMINOSAS UTILIZADAS
NA SUPLEMENTAÇÃO ANIMAL**

Monografia apresentada à coordenação de zootecnia da Universidade Federal do Maranhão como requisito indispensável para a obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Rafael Carvalho da Silva

Orientador: Prof. Dr. Claudener Souza
Teixeira

Chapadinha-Ma

2018

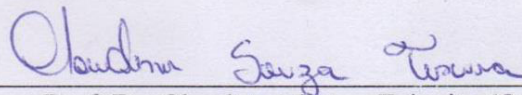
Rafael Carvalho da Silva

**EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LECTINAS
COM POSSÍVEL EFEITO ANTINUTRICIONAL DE LEGUMINOSAS UTILIZADAS
NA SUPLEMENTAÇÃO ANIMAL**

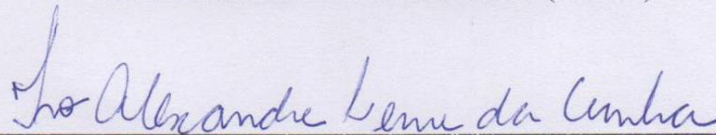
Monografia apresentada à coordenação de zootecnia da Universidade Federal do Maranhão como requisito indispensável para a obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Aprovado em: 23/10/2018

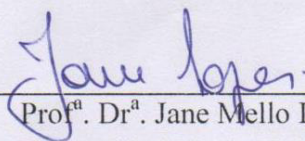
Banca Examinadora



Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)



Prof. Dr. Ivo Alexandre Leme da Cunha (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)



Prof.ª Dr.ª Jane Mello Lopes (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

CARVALHO DA SILVA, RAFAEL.

EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
LECTINAS COM POSSÍVEL EFEITO ANTINUTRICIONAL DE
LEGUMINOSAS UTILIZADAS NA SUPLEMENTAÇÃO ANIMAL / RAFAEL
CARVALHO DA SILVA. - 2018.

34 p.

Orientador(a): CLAUDENER SOUZA TEIXEIRA.

Curso de Zootecnia, Universidade Federal do Maranhão,
CHAPADINHA-MA, 2018.

1. Alimentos alternativos. 2. Atividade lectínica. 3.
Caracterização físico-química. 4. Forragem. I. SOUZA
TEIXEIRA, CLAUDENER. II. Título.

A Deus porque é pai, e dono de todo conhecimento. Aos meus pais Raimundo Fortes da Silva e Aldemires da Penha Carvalho, grandes colaboradores e incentivadores, a minha querida avó Ana Maria da Penha Carvalho *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado mesmo em momentos de dificuldades, e por ter me proporcionado a realização desse sonho.

Aos meus familiares por todos os momentos que compartilhamos juntos, ao meu pai esse grande homem, que durante sua vida já foi agricultor, ajudante de cozinha e garimpeiro para que eu pudesse hoje estar aqui. Agradeço a minha mãe pelas palavras de incentivo que me fizeram perseverar e nunca desistir diante das dificuldades. As minhas irmãs Raqueline Carvalho da Silva e Rainny Carvalho da Silva.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira pela oportunidade, paciência e, sobretudo pela confiança depositada nesses dois anos de convívio.

Agradeço ao Prof. Dr. Ivo Alexandre Leme da Cunha e a Prof^ª. Dr^ª. Jane Mello Lopes por aceitarem compor a mesa examinadora da minha monografia.

Aos meus colegas de laboratório, Karla, Renato, Helena, Ana Larissa, Nathália, Ana Lúcia e Valdenice, pelos bons momentos vivenciados.

Ao Francisco Ivo dos Santos Aguiar pelo carinho, e toda sua família especialmente a dona Conceição Aguiar e seu esposo Arinaldo Aguiar.

Agradeço também as minhas companheiras de república Lusiane e Allana, que estão junto comigo em busca de um futuro melhor.

Aos amigos que ganhei em Chapadinha, Kassio Ventury, Welisson Cintra, João Victor. Aos meus colegas de curso, pela amizade e ajuda nos trabalhos da Universidade.

A todos os meus professores, pelo carinho, dedicação e excelência no exercício da profissão, em especial ao professor Celso Yoji Kawabata *in memoriam*.

RESUMO

Fatores antinutricionais são compostos encontrados numa enorme variedade de produtos de origem vegetal, que quando ingeridas em excesso podem afetar a fisiologia dos animais comprometendo, assim, a produtividade. Dentre os antinutrientes, as lectinas se destacam como um grupo de proteínas capazes de reconhecer e ligar-se a resíduos de carboidratos presentes na superfície das microvilosidades intestinais, acarretando em lesão epitelial. Com esse trabalho objetivou-se avaliar a presença de lectinas nas espécies *Parkia platycephala*, *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Pueraria montana* e caracterizar parcialmente essas moléculas. As lectinas foram extraídas em três soluções de tamponamento Tris-HCl 25 mM pH 7,6 + NaCl 0,15 M; Glicina 0,1 M pH 2,6 + NaCl 0,15 M; Glicina 0,1 M pH 9,0 + NaCl 0,15 M. A presença das lectinas foi avaliada utilizando-se eritrócitos de coelho, bovino, caprino, ovino, galinha e humano. Posteriormente, as lectinas foram caracterizadas quanto ao perfil de reconhecimento a carboidrato, potencial de estabilidade em diferentes temperaturas e pH. As lectinas das espécies *P. platycephala*, *P. montana* apresentaram afinidade a hemácias de coelho, porém não reconheceram eritrócitos de outros animais. A lectina da espécie *M. caesalpiniiifolia* apresentou grande especificidade a maioria dos eritrócitos testados, coelho, bovino, caprino, ovino e do sistema A, B, O. Porém foi incapaz de reconhecer eritrócitos de galinha. Quanto aos testes de inibição da atividade hemaglutinante por meio de diferentes carboidratos e glicoproteínas, constatou-se que para a espécie *P. platycephala* os carboidratos Manose e *N*-acetil-D-glicosamina foram capazes de inibir a atividade dessa lectina nas concentrações de 50 e 6, 25 mM respectivamente, porém a atividade hemaglutinante da lectina da espécie *P. montana* foi inibida apenas por D-Galactose na concentração de 12,5 mM, para a espécie *M. caesalpiniiifolia* nenhum dos carboidratos ou glicoproteínas foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante dessa lectina na concentração de 100 mM. Em relação à caracterização térmica, identificou-se que com a elevação da temperatura de 30 para 40 °C a lectina da *P. montana* perdeu 50% da atividade hemaglutinante, sendo a mesma desnaturada a 50 °C. Quanto à lectina das espécies *P. platycephala* e *M. caesalpiniiifolia*, se mantiveram ativas a temperaturas mais elevadas, perdendo atividade somente aos 60 °C, 80 °C respectivamente. A caracterização por meio de diferentes pH revelou que, a lectina da espécies *P. platycephala* é completamente inativada em pH 4,0, 9,0, 10,0. Ao contrario, as lectinas das espécies *P. montana*, *M. caesalpiniiifolia* mostraram-se mais resistentes a variações de pH. Esse trabalho permitiu a identificação de pelo menos três lectinas nas espécies forrageiras estudadas. Essas substâncias, que possivelmente exercem efeito antinutricional foram completamente inativadas por meio de diferentes temperaturas e pH, o que poderá contribuir para elucidação de estratégias capazes de remover esses compostos, aumentando o valor nutricional desses alimentos.

Palavras-chave: Atividade lectínica, Caracterização físico-química, alimentos alternativos, Forragem.

ABSTRACT

Antinutritional factors are compounds found in an enormous variety of products of plant origin, which when ingested in excess can affect the physiology of the animals thus compromising productivity. Among the antinutrients, lectins stand out as a group of proteins capable of recognize and connect to residues of carbohydrates present on the surface of intestinal microvilli, leading to epithelial injury. This work aimed to evaluate the presence of lectins in species *Parkia platycephala*, *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Pueraria montana* and partially characterize these molecules. The lectins were extracted in three buffered solutions: Tris-HCl 25 mM pH 7,6 + NaCl 0,15 M; Glycine 0,1 M pH 2,6 + NaCl 0,15 M; Glycine 0,1 M pH 9,0 + NaCl 0,15 M. The presence of the lectins was evaluated using rabbit, bovine, goat, sheep, chicken and human erythrocytes. Afterwards, the lectins were characterized as to the carbohydrate recognition profile, stability potential at different temperatures and pH. The lectins of the species *P. platycephala*, *P. montana* showed affinity to rabbit red blood cells, but did not recognize erythrocytes from other animals. The lectin of the species *M. caesalpiniiifolia* presented great specificity to the majority of erythrocytes tested, rabbit, bovine, goat, sheep and system A, B, O. But it was unable to recognize chicken erythrocytes. As for the tests of inhibition of hemagglutinating activity by means of different carbohydrates and glycoproteins, it was verified that for the species *P. platycephala* the carbohydrates Manose and *N*-acetyl-D-glucosamine were able to inhibit the activity of this lectin in the concentrations of 50 and 6, 25 mM respectively, but the hemagglutinating activity of the lectin of the *P. montana* species was inhibited only by D-Galactose in the concentration of 12, 5 mM, for the *M. caesalpiniiifolia* none of the carbohydrates or glycoproteins were able to inhibit the hemagglutinating activity of this lectin in the concentration of 100 mM. Regarding the thermal characterization, we noticed that with the temperature increase from 30 °C to 40 °C the *P. montana* lectin lost 50% of the hemagglutinating activity, the one being denatured at 50 °C. As for the lectin of the species *P. platycephala* and *M. caesalpiniiifolia*, they remained active at higher temperatures, losing activity only at 60 °C, 80 °C, respectively. The characterization by means of different pH showed that the lectin of *P. platycephala* species is completely inactivated at pH 4.0, 9.0 and 10.0. On the other way, lectins of *P. montana*, *M. caesalpiniiifolia* species were more resistant to pH variations. This work allowed the identification of, at least, three lectins in the forage species studied. These substances, which possibly exert antinutritional effect, were completely inactivated through different temperatures and pH, which could contribute to the elucidation of strategies capable of removing these compounds, increasing the nutritional value of these foods.

Keywords: Lectin activity, Physico-chemical Characterization, alternative foods, Forage.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Título da atividade hemaglutinante das lectinas das espécies <i>P. platycephala</i> , <i>P. montana</i> , <i>M. caesalpinifolia</i> para eritrócitos de coelho..	23
Tabela 2 - Inibição da atividade hemaglutinante das lectinas de sementes das espécies <i>P. Platycephala</i> <i>P. montana</i> , <i>M. caesalpinifolia</i> por especificidade a carboidratos.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Parkia platycephala</i>	14
Figura 2 - Vagens de <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	15
Figura 3 - <i>Pueraria montana</i>	16
Figura 4 - Título da atividade hemaglutinante das lectinas das espécies <i>P. platycephala</i> , <i>P. montana</i> , <i>M. caesalpiniiifolia</i> para eritrócitos bovino, caprino, ovino, galinha, e do sistema A, B, O.....	24
Figura 5 - Influência da temperatura sobre a atividade hemaglutinante das lectinas das espécies <i>p. platycephala</i> , <i>P. montana</i> , <i>M. caesalpiniiifolia</i>	27
Figura 6- Influência do pH sobre a atividade hemaglutinante das lectinas das espécies <i>P. Platycephala</i> , <i>P. montana</i> , <i>M. caesalpiniiifolia</i>	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Lectinas de leguminosas	14
2.2 Características das espécies	14
2.2.1 <i>Parkia platycephala</i>	14
2.2.2 <i>Mimosa caesalpinifolia</i>	15
2.2.3 <i>Pueraria montana</i>	16
3. OBJETIVO	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Específicos	17
4. METODOLOGIA.....	18
4.1 Coleta do material vegetal e preparação da farinha	18
4.2 Obtenção dos sangues	18
4.3 Isolamento dos eritrócitos	18
4.4 Extração das proteínas	19
4.5 Atividade hemaglutinante	19
4.6 Determinação do título da atividade hemaglutinante.....	19
4.7 Especificidade das lectinas a carboidratos e glicoproteínas	20
4.8 Dependência das lectinas ao ph	20
4.9 Dependência das lectinas a temperatura	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Estudo da atividade hemaglutinante	22
5.2 Estudo da inibição por especificidade a carboidratos	24
5.3 Influência da temperatura sobre a atividade hemaglutinante.....	26
5.4 Estudo da influência do ph sobre a atividade hemaglutinante.....	28
6. CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

Oscilações sazonais nos preços dos alimentos que compõem as dietas dos animais de produção, levam os nutricionistas a buscarem constantemente alimentos alternativos que possam substituir nutricional e economicamente os ingredientes tradicionais utilizados nas formulações de rações (PARENTE et al., 2014). No entanto, uma das principais limitações na utilização de produtos de origem vegetal é a presença de fatores antinutricionais que podem afetar a digestibilidade dos nutrientes da dieta, comprometendo o desempenho animal (ANDRADE et al., 2015).

Estes compostos, que estão presentes em alimentos, podem provocar efeitos fisiológicos adversos e/ou diminuir sensivelmente a biodisponibilidade de nutrientes. Contudo, as propriedades dos fatores antinutricionais dependem do antinutriente em questão e sua concentração na formulação final da ração (LIMA JUNIOR et al., 2010).

Entre os compostos mais conhecidos estão: os inibidores de proteases, taninos, fitatos e lectinas (STECH et al., 2010). Dentre essas substâncias capazes de promover respostas adversas aos animais, as lectinas se destacam por integrarem um grupo heterogêneo de proteínas capazes de reconhecer sítios específicos ligando-se reversivelmente a diferentes tipos de carboidratos (LAM, 2010; SILVA et al., 2012).

Segundo Silva e Silva (2000), os efeitos antinutricionais das lectinas podem ser devido a habilidade incomum destas substâncias em reconhecer resíduos de carboidratos presentes na superfície das células intestinais, acarretando interferência não-específica na absorção de nutrientes.

Desta forma, quando ingeridas em excesso os principais efeitos prejudiciais das lectinas aos não-ruminantes referem-se à redução do desenvolvimento animal, diminuição da digestibilidade de carboidratos e o surgimento de lesões gastrointestinais (HEUGTEN, 2001; STECH et al., 2010).

Convém ressaltar, que as lectinas são substâncias sintetizadas naturalmente pelos vegetais e que atuam principalmente na defesa da planta contra a invasão microbiana. Nesse sentido a ação antinutricional das lectinas à fisiologia dos ruminantes está relacionada à inibição do desenvolvimento de diferentes tipos de microrganismos ruminais importantes que, atuam na fermentação de carboidratos fibrosos, além de interagirem com as células presentes na mucosa intestinal, prejudicando a absorção dos nutrientes, levando a ruptura e degradação dos microvilos seguido de lesão epitelial (LIMA JUNIOR et al., 2010).

Apesar de as lectinas serem encontradas em diversas partes dos vegetais, ocorrem em maior quantidade e com maior frequência nas folhas e sementes (SAMPIETRO et al., 2001).

Essas estruturas vegetais, são responsáveis por armazenar grande quantidade de proteínas e carboidratos, logo são os mais apreciados pelos animais principalmente no caso das leguminosas, que por sua vez ocupam lugar de destaque dentre as plantas forrageiras por apresentarem alto valor nutritivo e constituírem uma alternativa alimentar principalmente durante os períodos de estiagem (COSTA et al., 2011).

A região nordeste do Brasil, possui uma ampla diversidade de espécies de leguminosas utilizadas na alimentação de grandes e pequenos ruminantes. Todavia, muitas delas ainda não foram domesticadas (MAIA, 2004), ou ainda não se tem informações acerca das suas características nutricionais (MOURA et al., 2006). Em especial merecem destaque as espécies *Parkia platycephala*, *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Pueraria montana*, já que contribuem expressivamente com a dieta dos ruminantes (ALVES et al., 2007; VIEIRA et al., 2005; CSURHES, 2008).

Apesar de sua relevância para a nutrição animal, ainda são escassas as informações a cerca de lectinas de plantas utilizadas na alimentação animal, portanto, um conhecimento das características químicas desses compostos representaria um importante avanço na adequação dos produtos vegetais nas dietas dos animais (OLIVEIRA et al., 200).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Fatores antinutricionais são compostos encontrados numa enorme variedade de alimentos de origem vegetal, que quando consumidos, reduzem o valor nutricional desses alimentos. Essas substâncias interferem na digestão, absorção dos nutrientes e quando consumidas em excesso podem ocasionar severos danos á saúde animal, como diminuir sensivelmente a disponibilidade biológica dos aminoácidos essenciais, além de causar irritações e lesionar a mucosa gastrintestinal, afetando a eficiência dos processos biológicos (OLIVEIRA et al., 2000), a demais acarretando na redução da conversão alimentar (STEC et al., 2010).

O conhecimento da presença de fatores antinutricionais, que afetem o ganho de peso dos animais se faz cada vez mais necessário, tem-se assim, por exemplo, taninos que possuem a habilidade de precipitar proteínas, fitatos que são capazes de se complexarem com proteínas e minerais, e lectinas que podem causar efeitos danosos à fisiologia dos indivíduos e com isso prejudicar a assimilação dos nutrientes (ANDRADE et al., 2015).

Segundo Buttle e colaboradores (2001), uma das principais macromoléculas com potencial antinutricional são as lectinas presentes em folhas e sementes de leguminosas. Essas proteínas possuem a capacidade de se ligar a centros específicos na superfície das células responsáveis pela absorção dos nutrientes, levando ao rompimento das células epiteliais das microvilosidades intestinais, (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004), acrescentam ainda que, mesmo após diversos procedimentos empregados na manipulação dos ingredientes e sucessivas etapas do processo de digestão algumas lectinas pode continuar na sua forma ativa interferindo na absorção de nutrientes, provocando rápida perda de peso e atrofia do animal, afetando não só a produção mais também a reprodução podendo leva-lo a óbito.

Os animais não ruminantes podem sofrer ainda mais influências desses compostos, pois, além da redução do crescimento e danos ás microvilosidades intestinais, há excessiva produção de muco pelas células caliciformes na tentativa de minimizar os danos provocados por esses fatores sobre a superfície epitelial, podendo causar o desenvolvimento de tecidos (OLIVEIRA et al., 2000).

Com o progresso alcançado pelos estudos preliminares ou caracterizações parciais de lectinas de plantas, avanços importantes têm sido feitos na análise estrutural dessas lectinas. A caracterização estrutural de lectinas de leguminosas é uma técnica que possibilita identificar a presença de sítios de ligação, por meio dos quais as lectinas são capazes de interagir com carboidratos expostos na superfície de microrganismos, essa interação permite que as lectinas exerçam ação antibacteriana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas (OLIVEIRA et

al., 2008). No rúmen, as primeiras vivem em simbiose com os ruminantes e são essenciais para a manutenção do equilíbrio do ecossistema ruminal (MANTOVANI; BENTTTO, 2013).

2.1 LECTINAS DE LEGUMINOSAS

As lectinas vegetais fazem parte de um grupo de proteínas bastante estudado. E dentre as lectinas de plantas, as proteínas extraídas de leguminosas caracterizam-se como a classe mais conhecida. Tais moléculas chegam a corresponder de 2 a 10% do conteúdo total de proteínas de sementes (SILVA et al., 2001). Atualmente, mais de 100 lectinas de leguminosas já foram extraídas e aproximadamente 70 lectinas de varias espécies caracterizadas, desta forma as lectinas de leguminosas vêm ao longo dos anos assumindo papel de destaque (LORIS, 2002).

2.2 CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES

2.2.1 *Parkia platycephala*

Planta arbórea nativa da região nordeste do país a *Parkia platycephala*, Fabaceae leguminosa mais conhecida como fava de bolota ou ainda faveira. Caracteriza-se por ser uma espécie de grande interesse econômico, pois, sua madeira é bastante empregada na construção civil e na geração de energia, além disso, apresenta enorme potencial biotecnológico e paisagístico (PEREIRA et al., 2014).

Figura 1 - *Parkia platycephala*



Fonte: autor

Suas vagens e folhas constitui uma alternativa alimentar viável para suplementação dos ruminantes, principalmente durante o período seco do ano que é justamente quando a produção de gramíneas diminui, tornando-se assim uma importante fonte de energia para os animais (ALVES et al., 2007). Além disso, o uso da faveira na alimentação animal têm gerado

bons resultados, é o exemplo de Alves et al., (2011), que constataram a inclusão de 36,4% de vagens de faveira em substituição ao feno de capim-Tifton 85 nas dietas destinadas a ovinos promoveu uma maior retenção de nitrogênio, sugerindo que a inclusão desse alimento na dieta dos animais pode aumentar a eficiência de utilização da proteína bruta e reduzir a contaminação ambiental, visto que reduz a excreção de nitrogênio no ambiente.

2.2.2 *Mimosa caesalpiniiifolia*

A *Mimosa caesalpiniiifolia* é uma planta arbórea e de fácil propagação, sendo nativo da região nordeste. Esta espécie vem difundindo-se em todo o território brasileiro e atualmente pode ser encontrada em quase todos os estados (VIEIRA et al., 2005; MAIA, 2014).

Mimosa caesalpiniiifolia, sabiá ou ainda unha-de-gato como é mais conhecida, é uma espécie que faz parte da família das leguminosas. Tal espécie possui um grande valor econômico já que é muito utilizada na geração de energia, sua madeira bastante resistente é frequentemente empregada em construções e produção de estacas principalmente nos estados do Piauí e Maranhão. Além disso, O sabiá constitui uma importante fonte de proteína para os caprinos, ovinos e bovinos, pois, suas folhas chegam a armazenar até 17% de proteína bruta e são bastante apreciadas por esses animais. As suas flores tem características melíferas e sua casca é comumente usada na medicina popular como um anti-inflamatório natural (COSTA et al., 2011).

Figura 2 - Vagens de *Mimosa caesalpiniiifolia*



Fonte: autor

2.2.3 Pueraria montana

A *Pueraria* é uma leguminosa que tolera solos de baixa e média fertilidade, muito empregada em sistema de consórcio com gramíneas visando melhorar as características físicas e aumentar a matéria orgânica do solo, esta espécie é amplamente cultivada em varias regiões do mundo como Austrália, Nova Zelândia, América do Sul, África do Sul e Estados Unidos, e atualmente têm despertado o interesse de muitos produtores com o intuito de utilizá-la como cobertura de solo e principalmente na alimentação animal (CSURHES, 2008).

Figura 3 - *Pueraria montana*



Fonte: autor

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de lectinas nas espécies *Parkia platycephala*, *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Pueraria montana* e caracterizar parcialmente essas moléculas.

3.2 ESPECÍFICOS

- Extrair e identificar as lectina de sementes das espécies *Parkia platycephala*, *Mimosa caesalpiniiifolia* e *Pueraria montana*;
- Determinar o título da atividade hemaglutinante;
- Caracterizar as lectinas quanto à sua especificidade a carboidratos e glicoproteínas;
- Determinar as características físico-químicas em função dos parâmetros: temperatura e pH;

4. METODOLOGIA

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DA FARINHA

Quando maduras, foram coletadas sementes de *Parkia platycephala*, *Mimosa caesalpiniiifolia* e *Pueraria montana* no perímetro urbano da cidade de Chapadinha-MA.

Em seguida o material foi submetido a um processo de seleção, buscando-se retirar as sementes defeituosas que apresentaram algum problema mecânico. Logo após, as sementes selecionadas foram trituradas em motor elétrico tipo (moedor de café), obtendo-se uma farinha que foi peneirada e acondicionada em frascos de vidro para posterior utilização.

4.2 OBTENÇÃO DOS SANGUES

A fim de realizar os ensaios de atividade hemaglutinante e avaliar a especificidade das lectinas aos diferentes tipos sanguíneos, obtiveram-se amostras de sangue de coelho, sangue bovino, caprino e ovino, sangue de galinha e sangue humano. Para a obtenção dos eritrócitos de coelho, foi utilizado um animal adulto considerado saudável advindo da cunicultura mantida pelo Laboratório de Biologia Estrutural e Molecular, no Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da UFMA. Quanto ao sangue bovino decorreu de doações mantidas pelo matadouro público de Chapadinha-MA, o sangue ovino, caprino, bem como o sangue de galinha, foi doado pela Chácara São Raimundo localizada na zona rural de Bacabal-MA. Os eritrócitos humanos foram obtidos através de doações cedidas pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Maranhão – HEMOMAR, localizado na Cidade de Chapadinha-MA.

4.3 ISOLAMENTO DOS ERITRÓCITOS

As amostras de sangue obtidas foram transferidas para tubos falcon de 15 mL, e submetidas a um processo de lavagem em NaCl 0,15 M gelado, sendo centrifugadas por 9 vezes a uma velocidade de 1.500 rpm durante 5 minutos. Após cada lavagem o sobrenadante foi desprezado e as hemácias foram resuspendidas em NaCl 0,15 M até completar 12 mL.

Ao final das lavagens, obteve-se a papa de hemácias da qual se transferiu 360 µL para um tubo falcon de 15 mL, em seguida ocorreu à adição de NaCl 0,15 M, até completar 12 mL, obtendo-se assim os eritrócitos nativos à 3%.

Ademais, foram obtidos eritrócitos previamente tratados com as enzimas proteolíticas papaína e tripsina. Para este fim, adicionou-se 240 µL de tripsina ou papaína 0,5 mg mL⁻¹ a 12 mL eritrócito a 3%. Todas as soluções foram mantidas em repouso durante 30 minutos a 4 °C.

Posteriormente, foram realizadas 6 lavagens com NaCl 0,15 M, conforme explicitado anteriormente, ao final desta etapa foi obtido os eritrócitos a 3% tratados com as enzimas proteolíticas e utilizados para a determinação da atividade hemaglutinante.

4.4 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A farinha de sementes das três espécies foi utilizada na extração das proteínas, e por meio de três soluções de tamponamento contendo Glicina 0,1 M pH 2,6 + NaCl 0,15 M; TRIS-HCl 25 mM pH 7,6 + NaCl 0,15 M e Glicina 0,1 M pH 9,0 + NaCl 0,15 M, foi possível realizar a preparação de todos os extratos na proporção de 1:10 (m/v). Posteriormente, procedeu-se a pesagem de 3g de farinha, que foi transferida para um tubo falcon de 50 mL e logo em seguida adicionado 30 mL de tampão, os extratos foram mantidos sob agitação constante por 4 horas em temperatura ambiente, em seguida as amostras foram filtradas e só então transferidas para tubos falcon de 15 mL, os diferentes extratos proteico acondicionados nos tubos falcon de 15 mL foram submetidos uma única vez a centrifugação em centrífuga de bancada a uma velocidade de 1.500 rpm durante 5 minutos.

4.5 ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Conforme descrito por, Chevreuil e colaboradores (2007), na determinação da atividade hemaglutinante empregou-se placas de microtitulação, cada uma contendo 8 fileiras e 12 reservatórios cada, totalizando 96 poços nos quais foi adicionado em duplicata 50 µl de uma solução de Tris-HCl 25 mM, pH 7,6 + 50 µl da solução que continha as lectinas em seus diferentes pH + 50 µl de suspensão de eritrócitos a 3% tratados ou não com as enzimas proteolíticas. As placas foram deixadas em repouso por 2 horas a 28 °C, logo após esse período realizou-se a leitura da atividade hemaglutinante. Em seguida, os resultados matemáticos foram expressos por meio de potenciação (MARANHÃO et al., 2014).

4.6 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Para a determinação do título da atividade hemaglutinante foram utilizadas placas de microtitulação, cada uma contendo 8 fileiras e 12 reservatórios cada, computando 96 poços (PEREIRA et al., 2014). Procedeu-se a adição em duplicata de, 50 µl de Tris-HCl 25 mM em pH 7,6, e em seguida ocorreu a junção de 50 µl da solução proteica, este extrato foi diluído seriadamente até o penúltimo poço e por fim o restante da solução depositado no último poço. Posteriormente, foi adicionado em todos os poços menos no último de cada fileira 50 µl de

eritrócitos tratados ou não tratados com as enzimas papaína e tripsina, em seguida as soluções foram homogeneizadas suavemente.

Como controle positivo adicionou-se 50 μ l de Tris-HCl 25 mM com pH 7,6 + 50 μ l da amostra ConBr + 50 μ l dos eritrócitos, e para o controle negativo aplicou-se 50 μ l de Tris-HCl 25 mM com pH 7,6 + 50 μ l de cada tampão utilizado para extração das soluções proteicas + 50 μ l de eritrócitos. As placas foram mantidas em temperatura ambiente, por duas horas e o título da atividade hemaglutinante foi obtido e expresso em unidade de hemaglutinação por mL (UH.mL^{-1}).

4.7 ESPECIFICIDADE DAS LECTINAS A CARBOIDRATOS E GLICOPROTEÍNAS

A especificidade de ligação das lectinas vegetais a carboidratos foi determinada por meio de testes de inibição da atividade hemaglutinante, através do uso de diferentes carboidratos e glicoproteínas na concentração de 0,1 M. Os carboidratos testados nesse procedimento foram α -metil-D-manopiranosídeo, manose, D-glicose, *N*-acetil-D-glicosamina, L-raminose, D-fucose, D-galactose, α -D-lactose, β -D-Lactose, e as glicoproteínas, adenosina, mucina, conforme os métodos descritos por Pereira et al., (2014) e Chevreuil e colaboradores (2007).

Durante esta etapa experimental empregou-se placas de microtitulação, onde foram adicionados em todos os poços 50 μ l de Tris-HCl 25 mM pH 7,6, em seguida foi aplicado 50 μ L do carboidrato ou glicoproteína no primeiro poço e diluindo 3 vezes em cada poço e passando para o seguinte até o último poço, que ficou com 100 μ L, posteriormente, adicionou-se 50 μ L do extrato bruto em cada poço. As soluções foram suavemente homogeneizadas a fim de se facilitar a interação dos carboidratos com as lectinas e deixadas incubadas por uma hora, com o termino desse período de tempo aplicou-se até o antepenúltimo poço 50 μ L de solução de eritrócitos que a lectina apresentou melhor atividade.

Após duas horas, foi possível avaliar visualmente o resultado da inibição da atividade hemaglutinante, sendo definida como a menor concentração de carboidratos e/ou glicoproteínas capaz de inibir a atividade hemaglutinante (CIM) e expressa em (mM ou mg.mL^{-1}).

4.8 DEPENDÊNCIA DAS LECTINAS AO pH

Por meio de diferentes soluções tampão, tornou-se possível avaliar o comportamento das lectinas oriundas das sementes de cada uma das três espécies. Para tal, fez-se uso de testes de atividade hemaglutinante. Logo, as amostras proteicas foram incubadas a

uma temperatura de 37 °C em diferentes soluções tampão cujo o pH variou 4,0 a 10,0 contendo NaCl 0,15 M. Em seguida, foi realizada a aplicação de eritrócitos à 3% sendo incubados novamente por duas horas (PEREIRA JUNIOR, 2014).

4.9 DEPENDÊNCIA DAS LECTINAS A TEMPERATURA

Determinou-se o efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante mediante as amostras serem acondicionadas em tubos de ensaio e submetidas a diferentes temperaturas, que variaram de 30 a 100 °C, durante 30 minutos. De posse das amostras previamente aquecidas, foi possível empregarem-nas na determinação da atividade hemaglutinante para todas as amostras (MARANHÃO et al., 2014). Os maiores títulos de emaglutinação são a representação matemática para a quantidade de raias com hemaglutinação de uma determinada amostra, sendo obtidos por meio de potenciação que é o método mais comumente utilizado (GRANGEIRO et al., 1990; PEREIRA et al., 2014; MARANHÃO et al., 2014).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Após, a preparação da farinha, foi possível utilizá-la para a obtenção dos extratos brutos das sementes de *P. platycephala* em diferentes soluções, que ao serem obtidos propiciou identificar a atividade hemaglutinante para todos os extratos com eritrócitos de coelho a 3%, nativos e tratados enzimaticamente. O título da atividade hemaglutinante revelou ainda que, a lectina reconhece preferencialmente eritrócitos de coelho tratados enzimaticamente a glóbulos vermelhos nativos (Tabela 1). Em relação à extração proteica, o TRIS-HCl 25 mM pH 7,6 + NaCl 0,15 M, mostrou-se a solução-tampão mais eficiente aglutinando eficazmente eritrócitos de coelho tratados com tripsina apresentando um título de (256 UH.ML⁻¹), os demais extratos brutos apresentaram título de (128 UH.mL⁻¹) para eritrócitos tratados previamente com papaína e de (32 UH.mL⁻¹) para eritrócitos nativos (Tabela 1).

Uma vez obtidos os extratos proteicos de sementes de *Pueraria montana*, tais soluções foram utilizadas para a detecção de atividade lectínica. Com isso, pode-se observar que, a lectina em questão reconhece não somente eritrócitos de coelho expostos à ação das proteases, mais também eritrócitos nativos. Toda via, cabe ressaltar que a titulação da atividade hemaglutinante revelou que a proteína possui maior atividade hemaglutinante em eritrócitos com tratamento enzimático com os 3 extratos brutos conforme (Tabela 1). A demais, observou-se que o extrato obtido em glicina 0,1 M pH 9,0 + NaCl 0,15 M, apresentou um título maior contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina (64 UH.mL⁻¹) se comparado aos demais extratos brutos que apresentaram título de (32 UH.mL⁻¹) para eritrócitos papainado e (16 UH.mL⁻¹) para eritrócitos nativos (Tabela 1).

Os métodos utilizados para a extração da lectina de sementes do sabiá também foram aqueles comumente usados para proteínas vegetais, que envolvem a extração por meio de soluções salinas (PEREIRA et al., 2014). Possibilitando, a obtenção de diferentes extratos, preparados com a farinha de sementes da *M. caesalpiniiifolia*, que foram posteriormente utilizados em ensaios de hemaglutinação.

Após análises visuais, foi observado que os diferentes extratos proteicos apresentaram hemaglutinação na presença dos eritrócitos de coelho nativos e tratados com as enzimas proteolíticas (Tabela 1). Além disso, notou-se que o extrato obtido em TRIS-HCl 25 mM pH 7,6 + NaCl 0,15 M, apresentou um título maior contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina (128 UH.mL⁻¹) e papaína (64 UH.mL⁻¹), em relação a eritrócitos nativos (32 UH.mL⁻¹).

Tabela 1 - Título da atividade hemaglutinante das lectinas das espécies *P. platycephala*, *P. montana*, *M. caesalpinifolia* para eritrócitos de coelho.

ESPÉCIES	TAMPÕES	ERITRÓCITOS DE COELHO		
		NORMAL	TRIPSINADO	PAPAÍNADO
<i>P. platycephala</i>	Tampão 1	32	256	128
	Tampão 2	32	128	128
	Tampão 3	16	64	64
<i>P. montana</i>	Tampão 1	16	32	32
	Tampão 2	8	32	16
	Tampão 3	16	64	32
<i>M. caesalpinifolia</i>	Tampão 1	32	128	64
	Tampão 2	8	64	64
	Tampão 3	16	64	32

Tampão 1: Tris-HCl 25 mM pH 7,6 + NaCl 0,15 M; tampão 2: Glicina 0,1 M pH 2,6 + NaCl 0,15 M; tampão 3: Glicina 0,1 M pH 9,0 + NaCl 0,15 M

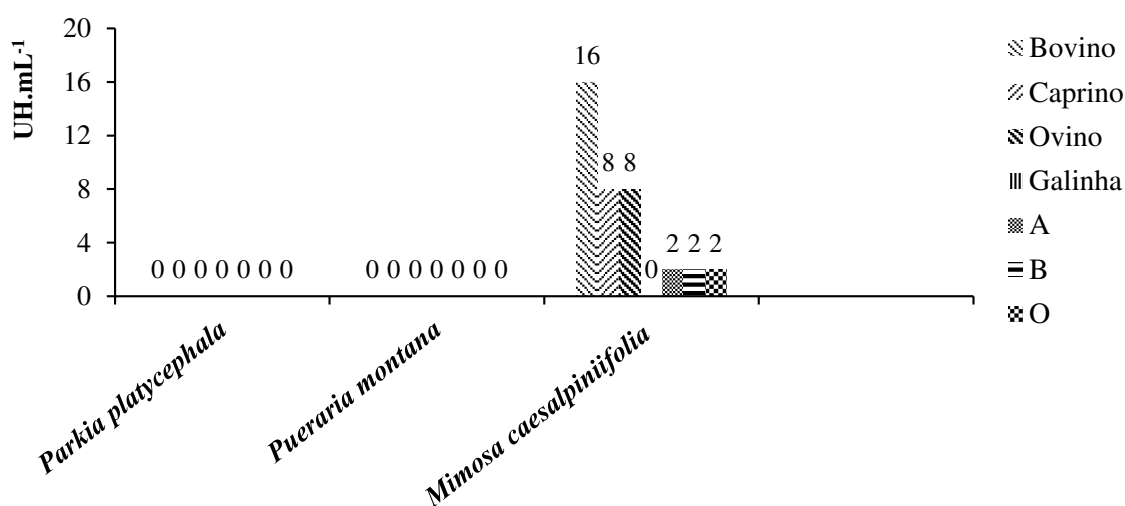
Diversos estudos acerca de lectinas afirmam que, na maioria das vezes essas proteínas tem sua atividade hemaglutinante aumentada através do tratamento dos eritrócitos com enzimas proteolíticas, isso porque essas enzimas atuam clivando certas proteínas da superfície dos eritrócitos expondo os carboidratos mais internos que integram o glicocálice, o acesso irrestrito a um número maior de carboidratos, possibilita a potencialização dos títulos de hemaglutinação (NAGANO et al., 2002; PINTO et al., 2008).

Reconhecidamente, a lectina das sementes de *P. platycephala*, caracteriza-se por aglutinar eritrócitos de coelho (FERNANDES, 2012). Desse modo, os resultados obtidos assemelham-se aos de Grangeiro et al., (1990), onde demonstraram que a lectina de *P. platycephala* não possui atividade hemaglutinante para eritrócitos do sistema ABO, porém possui grande afinidade a eritrócitos de coelho. Em estudos de ocorrência de lectinas em sementes de leguminosas, realizados por Pereira et al., (2014), os autores encontraram resultados divergentes pois, os extratos de *P. platycephala* apresentaram maior seletividade para eritrócitos de ovinos, e não apresentando afinidade para eritrócitos de coelho.

A lectina da espécie *P. montana* apresentou perfil hemaglutinante bastante semelhante as lectinas das espécies *Dioclea violácea*, *Canavalia ensiformis* e *Canavalia brasiliensis*, pois, esta também a apresentou grande afinidade a eritrócitos de coelho (MOREIRA et al., 1993; CAVADA et al., 2001). Maranhão et al., (2014), também obteve resultados semelhantes para a lectina das sementes de *Dioclea bicolor*, a qual reconhece eritrócitos de coelho, porém mostrou-se incapaz de aglutinar hemácias de outros animais.

Acerca do teste da atividade hemaglutinante com eritrócitos bovino, caprino, ovino, galinha e humano, não foi possível detectar hemaglutinação para as espécies *P. platycephala* e *P. montana*. No entanto a espécie *M. caesalpinifolia* apresentou títulos de hemaglutinação (16 UH.mL⁻¹), (8 UH.mL⁻¹), (8 UH.mL⁻¹), (2 UH.mL⁻¹), (2 UH.mL⁻¹), (2 UH.mL⁻¹), para os eritrócitos bovino, caprino, ovino e do sistema A, B, O, respectivamente, porém não apresentou afinidade para eritrócitos de galinha (Figura 4).

Figura 4 - Título da atividade hemaglutinante das lectinas das espécies *P. platycephala*, *P. montana*, *M. caesalpinifolia* para eritrócitos bovino, caprino, ovino, galinha, e do sistema A, B, O.



5.2 ESTUDO DA INIBIÇÃO POR ESPECIFICIDADE A CARBOIDRATOS

A atividade hemaglutinante da lectina das sementes da *P. Platycephala* foi inibida por α -metil-D-manopiranosídeo (6,25 mM), manose (50 mM). Porém, os demais carboidratos e glicoproteínas testados (D-glicose, N-acetil-D-glicosamina, L-raminose, D-fucose, D-galactose, α -D-lactose, β -D-lactose, adenosina, mucina), não foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante da lectina a uma concentração de 100 Mm (Tabela 2).

Quanto ao perfil de reconhecimento a carboidrato da lectina de *P. montana*, identificou-se que a atividade hemaglutinante da mesma tornou-se nula na presença do carboidrato D-Galactose na concentração de (12,5 mM). Os demais carboidratos testados bem como as duas glicoproteínas não inibiram a atividade hemaglutinante dessa lectina na concentração de 100 Mm (tabela 2).

Em relação à seletividade da lectina da *M. caesalpinifolia* a carboidratos. Os testes de inibição mostraram que, nenhum dos carboidratos ou glicoproteínas testados foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante para essa lectina na concentração de 100 mM (tabela 2).

Tabela 2 - Inibição da atividade hemaglutinante das lectinas de sementes das espécies *P. Platycephala*, *P. montana*, *M. caesalpinifolia* por especificidade a carboidratos.

Carboidratos	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA *		
	<i>Parkia platycephala</i>	<i>Pueraria montana</i>	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>
Glicose	NI	NI	NI
Manose	50	NI	NI
α -metil-D-manopiranosídeo	6,25	NI	NI
<i>N</i> -acetil-D-glicosamina	NI	NI	NI
L-Raminose	NI	NI	NI
D-Fucose	NI	NI	NI
D-Galactose	NI	12,5	NI
α -D-Lactose	NI	NI	NI
β -D-Lactose	NI	NI	NI
Glicoconjugados			
Adenosina	NI	NI	NI
Mucina	NI	NI	NI

*Concentração inibitória mínima (mM)

NI- Não inibiu na concentração de 100 mM

A especificidade a carboidrato da lectina de *P. Platycephala* mostrou-se semelhante ao resultado obtido para a lectina de *D. lasiophylla* em relação ao carboidrato manose (PINTO-JÚNIOR et al., 2013). Perfil similar também foi observado para a lectina de sementes de *Canavalia grandiflora*, que além de apresentar afinidade a manose, mostrou-se ligante a glicose (CECCATO et al., 2002).

Em geral quando uma lectina apresenta maior afinidade α -metil-D-manopiranosídeo em relação à manose, associa-se este fato a presença de um substituinte hidrofóbico no derivado da manose, que possibilita interações adicionais entre regiões hidrofóbicas do sítio de ligação da lectina (RAMOS et al., 2002).

Em relação aos resultados obtidos para a espécie *P. montana*, pode-se destacar que a proteína em questão apresenta perfil de reconhecimento a carboidrato muito semelhante à lectina de sementes da *Luetzelburgia auriculata*, que se mostrou ligante a D-galactose (OLIVEIRA et al., 2002). Maranhão et al., (2014), também obteve resultados parecidos para a lectina de *Dioclea bicolor* benth, pois a mesma teve sua atividade hemaglutinante

completamente inibida por D-galactose, apresentando também afinidade aos carboidratos: Lactose/N-acetil-D-galactosamina.

A maioria das lectinas da subfamília *Diocleinae*, apresenta afinidade a outros carboidratos tal qual da série glicose. Toda via, estudos destacam o surgimento de um novo grupo de lectinas que se diferenciam das clássicas lectinas glicose/manose. Uma das características dessas proteínas é a afinidade a lactose (MELGAREJO et al., 2005; MARANHÃO et al., 2014).

Grande parte dos estudos com lectinas de leguminosas envolve a sub-família *Papilionoideae*, enquanto investigações sobre lectinas da sub-família *Mimosoideae*, a qual pertence a lectina da *M. caesalpiniiifolia* são escassas (PEREIRA et al., 2014).

A presença de lectinas nos alimentos de origem vegetal pode ser detectada pelo ensaio de hemaglutinação em eritrócitos humanos ou de outras espécies animais. Ainda assim, os ensaios de hemaglutinação não podem ser considerados conclusivos para a detecção de lectinas, pois, além dessas substâncias outros antinutrientes como os taninos, possuem a habilidade de aglutinar hemácias, sendo necessário realizar outros testes de caracterização, como a inibição por especificidade a carboidratos (KWAGISHI et al., 2001; JAYATI, et al., 2005).

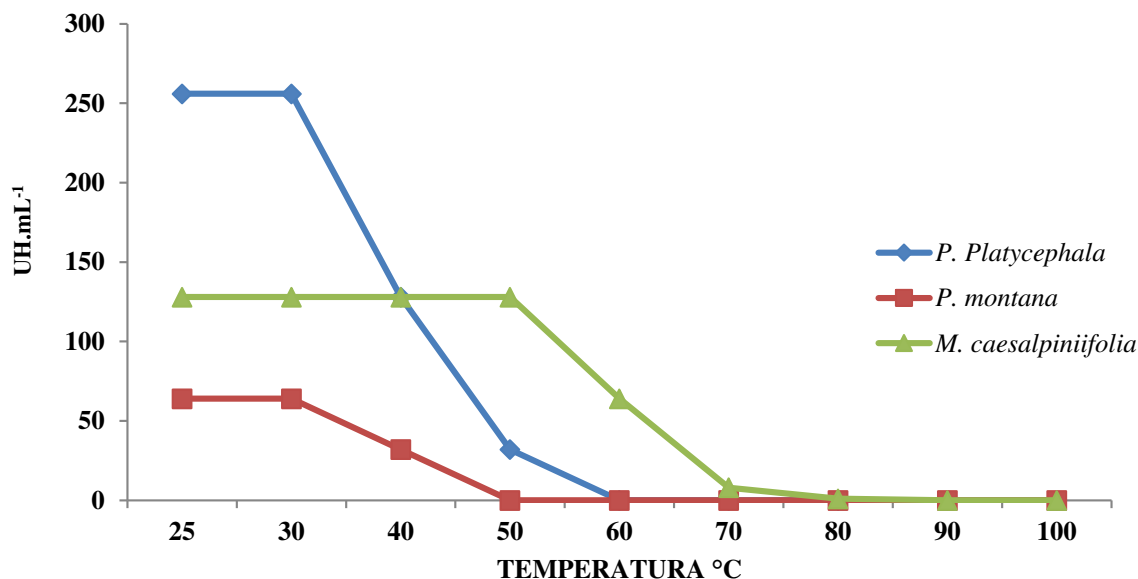
5.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A atividade hemaglutinante da lectina das sementes de *P. Platycephala* mostrou-se estável a uma temperatura de 30 °C, mantendo sua atividade total (256 UH.ML⁻¹). No entanto, quando submetida a uma temperatura de 60 °C, perdeu completamente sua atividade (Figura 5).

A lectina da *P. montana* apresentou relativa redução da atividade hemaglutinante logo após ser submetida à temperatura de 40 °C, durante 30 minutos (Figura 5), e sendo completamente inativada a 50 °C.

Em relação à lectina da *M. caesalpiniiifolia* a mesma mostrou-se mais resistente às variações de temperatura, mantendo sua atividade máxima entre 25 °C e 50 °C (128 UH.mL⁻¹), porém quando submetida a uma temperatura de 70 °C durante 30 minutos apresentou significativa redução da atividade hemaglutinante. A partir desta temperatura o título de hemaglutinação começou a decrescer e sendo a atividade hemaglutinante totalmente perdida a 80 °C (Figura 5).

Figura 5 - Influência da temperatura sobre a atividade hemaglutinante das lectinas das espécies *P. platycephala*, *P. montana*, *M. caesalpiniiifolia*.



Embora não tenha conseguido manter sua atividade total com o aumento da temperatura de 30 °C para 40 °C, a lectina das sementes de *P. Platycephala* demonstrou moderada resistência a variações de temperatura, se assemelhando a lectina de *Dioclea reflexa*, que também reconhece manose (PINTO-JÚNIOR et al., 2016).

Além disso, a caracterização através da temperatura evidenciou que as lectinas das espécies *P. montana*, *M. caesalpiniiifolia* permanecem ativas mesmo em temperaturas acima de 40 °C, essa particularidade é comum a maioria das lectinas de leguminosas (OLIVEIRA et al., 2002), resultados semelhantes foram encontrados por Maranhão et al., (2014), nesse estudo os autores afirmam que a lectina das sementes de *Dioclea bicolor*, também permanece ativa em temperaturas mais elevadas.

Mancini Filho et al., (1979), trabalhando com lectinas extraídas de sementes de leguminosas constatou que existem certos grupos de proteínas capazes se manterem ativas a temperaturas mais altas, porém logo após são inativadas, por tanto, dentre os fatores antinutricionais as lectinas podem ser consideradas instáveis ao tratamento térmico (SILVA; SILVA, 2000). Pois, o calor constitui um agente caotrópico, aumentando a entropia vibracional dos grupamentos da lectina, bem como de outras proteínas em geral, o que favorece a ruptura das ligações não covalentes que estabilizam o estado nativo, promovendo sua desnaturação (FONSECA et al., 2006).

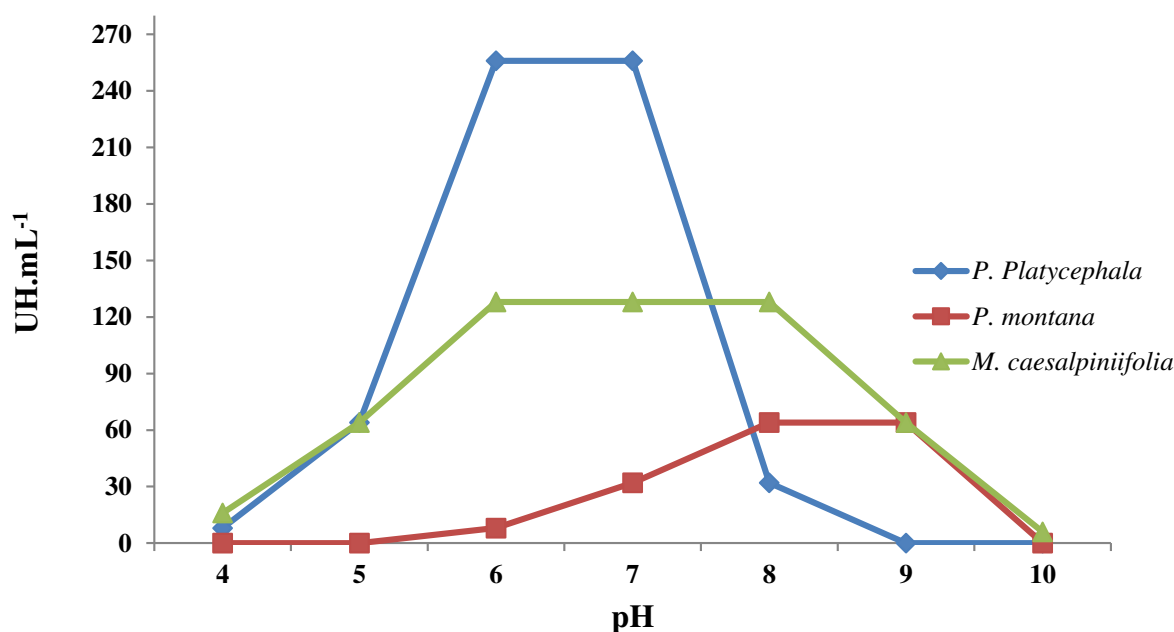
5.4 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO pH SOBRE A ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A lectina de sementes de *P. Platycephala* manteve-se inalterada em uma ampla faixa de pH (Figura 6), sendo que os maiores títulos de hemaglutinação foram observados no pH de 5,0, 6,0, 7,0, indicando que possivelmente está é a faixa de pH ótima para atividade dessa lectina.

Quanto à atividade hemaglutinante da lectina de sementes da *P. montana*, percebeu-se que também se manteve estável em uma escala de pH (Figura 6), excetuando-se os valores extremos de pH, onde a proteína em questão perdeu completamente sua atividade.

A atividade lectínica manteve-se constante para a espécie *M. caesalpinifolia*, em uma faixa de pH de 6,0, 7,0 e 8,0. No entanto, no pH 4,0, 5,0, 9,0, e 10, foram encontrados apenas (16UH.mL⁻¹), (64UH.mL⁻¹), (64UH.mL⁻¹), (32UH.mL⁻¹), respectivamente (Figura 6).

Figura 6- Influência do pH sobre a atividade hemaglutinante das lectinas das espécies *P. Platycephala*, *P. montana*, *M. caesalpinifolia*.



Os maiores títulos de hemaglutinação para a lectina de *P. Platycephala*, foram observados a partir do pH 5,0. Ao contrário, Grangeiro et al., (1990) afirmou que a lectina de sementes de *Parkia platycephala* apresenta maior atividade hemaglutinante em pH 4,0.

A lectina da *P. montana* demonstrou possuir maior resistência a variações de pH do que a lectina de *D. reflexa*, pois, está última necessita de pH próximo a 7,0 para permanecer com sua atividade total (PINTO-JÚNIOR et al., 2016).

Em relação à resistência aos efeitos do pH, torna-se possível afirmar que a lectina da *M. caesalpiniiifolia* possui maior resistência que a lectina de sementes de *Ficus cunia*, tendo em vista que, está última quando submetida a um aumento do pH de 2,0 para 7,0 resultou na diminuição da capacidade de aglutinar hemácias, e perda total da atividade em pH acima de 8,0 (RAY et al., 1992). Isso, porém, não ocorre com todas as lectinas, diversos estudos afirmam que uma mesma proteína pode manter-se estável em uma ampla faixa de pH, podendo apresentar atividade tanto em meio ácido quanto básico (NICOLSON et al., 1974; POVINELI; FINARDI FILHO, 2002).

6. CONCLUSÃO

A realização desse trabalho possibilitou a identificação de pelo menos três lectinas nas espécies *P. platycephala*, *M. caesalpiniiifolia* e *P. montana*. Sendo que este é o primeiro relato da ocorrência de lectinas na espécie *M. caesalpiniiifolia*. Também foi possível detectar a especificidade das diferentes lectinas em reconhecer carboidratos. Além disso, identificou-se que as lectinas das três espécies estudadas apresentaram diferentes resistências a temperatura e pH.

São necessários mais estudos a cerca das características físico-químicas e estruturais dessas lectinas a fim de elucidar possíveis estratégias de inativação dos fatores antinutricionais presentes nesses alimentos, proporcionando assim, melhorias para a produção animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, A. A.; SALES, R. O.; NEIVA, J. N. M.; MEDEIROS, A. N.; BRAGA, A. P.; AZEVEDO, A. R. Degradabilidade ruminal in situ de vagens de faveira (*Parkia platycephala* Benth.) em diferentes tamanhos de partículas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 59, 1045-1051, 2007.
- ALVES, A. Z.; SALES, R. O.; NEIVA, J. N. M.; MEDEIROS, A. N.; BRAGA, A. P.; AZEVEDO, D. M. M. R.; SILVA, L. R. F. Metabolismo de compostos nitrogenados em ovinos alimentados com dietas contendo vagens de faveira. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** 12, 1051-1066, 2011.
- ANDRADE, T. V.; SANTOS, R. N. V.; ARAÚJO, D. J.; BRAULINO, D.; MOURA, M. V. T. P.; BORGES, L. S. Efeito de fatores antinutricionais encontrados nos alimentos alternativos e seu impacto na alimentação de não ruminantes. **Nutritime**, 12, 4393-4399, 2015.
- BUTTLE, L. G.; BURRELLS, A. C.; GOOD, J. E.; WILLIAMS, P. D.; SOUTHGATE, P. J.; BURRELLS, C. The binding of soybean agglutinin (SBA) to the intestinal epithelium of Atlantic salmon, *Salmo salar* and rainbow trout, *Oncorhynchus mikiss*, fed high levels of soybean meal. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 80, 237-244, 2001.
- CAVADA, B. S. et al. Revisiting *proteus*: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein & Peptide Science**, 2, 1-13, 2001.
- CECCATO, V. M.; CAVADA, B. S.; NUNES, E. P.; NOGUEIRA, N. A. P.; GRANGEIRO, M. B.; MORENO, F. B. M. B.; TEIXEIRA, E. H.; SAMPAIO, A. H.; ALVES, M. A. O.; RAMOS, M. V.; CALVETE, J. J.; GRANGEIRO, T. B. Purification and partial characterization of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth. Seeds. **Protein and Peptide Letters**. 9, 67-73, 2002.
- CHEVREUIL, L. R.; Pando, S. A.; Nina, A. R.; Bariani, A.; José Francisco de Carvalho Gonçalves, J. F. C.; Santos, A. L. W. Atividade de Proteínas Hemaglutinantes em Sementes de Leguminosas Arbóreas da Flora Amazônica. **Revista Brasileira de Biociências**, 5, 1020-1022, 2007.
- COSTA, M. R. G. F.; MARIA, C. S. S.; PEREIRA, S. E.; MAGALHÃES, A. J.; COSTA, L. N.; MORAIS NETO, B. L.; MOCHEL FILHO, E. J. W.; BEZERRA, A. P. A. Utilização do feno de forrageiras lenhosas nativas do Nordeste brasileiro na alimentação de ovinos e caprinos. **Pubvet**. 5, 2011.
- CSURHES, S. Kudzu (*Pueraria montana* var. *lobata*) infestation on the Gold Coast. **Brisbane**. 2008.
- FERNANDES, A. V. Caracterização bioquímica e avaliação da atividade antifúngica de lectinas de sementes de Fabaceae da Amazônia. **Tese de Doutorado Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia – UFAM**. 2012.

- FONSECA, L. C.; CORRÊA, N. C. R.; GARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; PENHA-SILVA, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Quim. Nova.** 543-548, 2006.
- GRANGEIRO, T. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Estudos preliminares de uma lecitina de sementes de *Parkia Platycephala* Benth. **Acta botânica brasileira.** 4, 69-74, 1990.
- HEUGTEN, E. Van. Micotoxins and other antinutritional factors in swine feeds. In: LEWIS, A. J.; SOUTHERN, L. L. (Ed.). **Swine Nutrition.** 2nd ed. Boca Raton, 563-584, 2001.
- JAYATI, B.; ARUN, K. G.; BISHNU, P. C. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydrate Research.** 340, 1973-1983, 2005.
- KWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry.** 56, 53-58, 2001.
- LAM, S. K.; N. G. T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 89, 45-55, 2010.
- LIMA JUNIOR, D. M. L.; MONTEIRO, P. B. S.; RANGEL, H. N.; MACIEL, M. V.; OLIVEIRA, S. E. O.; FREIRE, D. A. Fatores anti-nutricionais para ruminantes. **Acta Veterinaria Brasilica,** 4, 132-143, 2010.
- LORIS, R. Principles of structures of animal and plante lectins. **Bioch Bioph Acta.** 198-208. 2002.
- MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. 1. ed. São Paulo: **D&Z Computação Gráfica e Editora.** 413, 2004.
- MANCINI FILHO, J., LAJOLO, F.M., VIZEU, D.M. Lectins from red kidney beans: radiation effect on agglutinating and mitogenic activity. **Journal of Food Science.** 1194-1196, 1979.
- MANTOVANI, H. C.; BENTTO, C. B. P. Manipulação da Fermentação microbiana ruminal para máxima eficiência animal. **II SIMBOV – II Simpósio Matogrossense de Bovinocultura de Corte .** UFMG, 2013.
- MARANHÃO, P. A. C.; FREIRE, J. E. C.; GONÇALVES, J. F. C.; FERNANDES, A. V. Otimização e avaliação da atividade hemaglutinante (ahe) de extratos protéicos obtidos de sementes de *dioclea bicolor* benth. **Revista Diálogos Acadêmicos,** 3, 1, 2014.
- MELGAREJO, L. M.; VEGA, N.; PÉREZ, G. Isolation and characterization of novel lectins from *Canavalia ensiformis* DC and *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth. seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology.** 17, 315–24, 2005.
- MOREIRA, R. A.; CORDEIRO, E. F.; CAVADA, B. F.; NUNES, E. P.; FERNANDES, A. F. G.; OLIVEIRA, J, T. A. Plant seed lectins. A possible marker for chemotaxonomy of the genus canavalia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal,** 127-132, 1993.

MOURA, O. N.; PASSOS, M. A. A.; FERREIRA, R. L. C. Distribuição de biomassa e nutrientes na área de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. **Revista Árvore**. 30, 877-884, 2006.

MOURA, O. N.; PASSOS, M. A. A.; FERREIRA, R. L. C. Distribuição de biomassa e nutrientes na área de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. **Revista Árvore**. 30, 877-884, 2006.

NAGANO, C. S.; MORENO, F. B. M. B.; BLOCH JUNIOR, C.; PRATES, M. V.; CAVALCANTE, J. J.; SAKER-SAPAIO, S.; FARIAS, W. R.L.; TAVARES, T.D.; NASCIMENTO, K. S.; GRANGEIRO, T.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. Purification and characterization of a new lectin from the red *Hypnea musciformis*. **Protein and Peptide letters**, 159-165, 2002.

NICOLSON, G.L.; BLAUSTEIN, J.; ETZLER, M.E. Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. **Biochemistry**. 13, 196-204, 1974.

OLIVEIRA, J. T. A. et al. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**. 61, 301–10, 2002.

OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. A. S.; SANTOS MAGALHÃES, N. S.; COELHO, L. C. B.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO DA CUNHA, M. G.; CORREIA, M.T.S. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**. 46, 371–376, 2008.

OLIVEIRA, P. B.; MURAKAMI, A. E.; GARCIA, E. R. M.; MACARI, M.; SCAPINELLO, C. Influência de Fatores Antinutricionais da *Leucaena leucocephala* e *Leucaena cunninghamii* e do Feijão Guandu (*Cajanus cajan*) Sobre o Epitélio Intestinal e o Desempenho de Frangos de Corte. **Rev. bras. zootec.** 29, 1759-1769, 2000.

PARENTE, I. P.; RODRIGUES, K. F.; VAZ, R. G. M. Vieira.; SOUSA, J. P. L.; SANTOS, N. E. R.; ALBINO, L. F.T.; SIQUEIRA, J. C. de.; PAIVA, J. A. de. Características nutricionais e utilização do resíduo de batata-doce em dietas de frangos de crescimento lento. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.** 15, 470-483, 2014.

PEREIRA JUNIOR, F. N. Caracterização estrutural parcial e biológica de uma lectina de sementes de *Dioclea reflexa* HOOK F. **Tese de Doutorado-UFC**, 2014.

PEREIRA, S. P.; OLIVEIRA, J. A.; ROCHA, G. H.; BARROS, M. L.; DRUMOND, A. M. Utilização de extratos de sementes de visgueiro, pau-d'óleo e pau-ferro para detectar a presença de lectinas através da atividade hemaglutinante com eritrócitos. **Revista Saúde e Ciência, On-line**. 3, 1-10, 2014.

PINTO, L. S.; NAGANO, V.P.; OLIVEIRA, T. M.; MOURA, T. R.; SAMPAIO, A. H.; DEBRAY, H.; PINTO, V. P.; DELLAGOSTIN, O. A.; CAVADA, B. S. Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **J Biosci**, 355-365, 2008.

PINTO-JÚNIOR, V. R.; CORREIA, J. L. A.; PEREIRA, R. I.; PEREIRA-JUNIOR, F. N.; SANTIAGO, M. Q.; OSTERNE, V. J. S.; MADEIRA, J. C.; CAJAZEIRAS, J. B.;

NAGANO, C. S.; DELATATORRE, P.; ASSREUY, A. M. S; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seedes with inflammatory activity. **Journal molecular recognition**. 134-141, 2016.

PINTO-JÚNIOR, V. R.; DE SANTIAGO, M. Q.; OSTERNE, V. J. S.; CORREIA, J. L. A.; PEREIRA-JÚNIOR, F. N.; CAJAZEIRAS, J. B.; DE VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, E. H.; DO NASCIMENTO, A. S. F.; MIGUEL, T. B. A. R.; MIGUEL, E. C.; SAMPAIO, A. H.; DO NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S. Purification, Partial Characterization and Immobilization of a Mannose-Specific Lectin from Seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart. **Molecules**. 18, 10857-10869, 2013.

POVINELI, K. L.; FINARDI FILHO, F. The multiple functions of plant lectins. **Nutrire; rev. Soc. Bras. Alim**. 24, 135-156, 2002.

RAMOS, M. V.; MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; ROUGE, P. Interaction of lectins from the sub tribe Diocleinae with specific ligands. **R. Bras. Fisiol. Veg**. 8, 193-199, 2002.

RAY, S.; AHMED, H.; BASU, S.; CHATTERJEE, B.P. Purification, characterization, and carbohydrate specificity of the lectin of *Ficus cunia*. **Carbohydr. Res**. 242, 247-63, 1992.

SAMPIETRO, A. R.; ISLÃ, M. I.; QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea*. **Fruits. Plant Science**. 160, 659-667, 2001.

SILVA, A. L. C. S.; HORTA, A. C. G.; MOREIRA, R. A. M. Isolation na partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) vog. Ex. Steua. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 13, 262-268, 2001.

SILVA, C. C. M.; SANTANA, A. L.; MENTELE, R.; FERREIRA, S. R.; MIRANDA, A.; SILVA-LUCCA, A. R.; SAMPAIO, U. M.; CORREIA, S. T.; OLIVEIRA, L. M. Purification, primary structure and potencial functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. **Process Biochemistry**. 47, 1049-1059, 2012.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Brazilian Journal of Nutrition**. 13, 3-9, 2000.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P.; Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Rev. Nutr**. 3-9, 2000.

STECH, M. R.; CARNEIRO, D. J.; CARVALHO, M. R. B.; Fatores antinutricionais e coeficientes de digestibilidade aparente da proteína de produtos de soja para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. 32, 255-262, 2010.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**. 44, 385-403, 2004.

VIEIRA, E. L.; CARVALHO, F. F. R.; BATISTA, A. M. V.; FERREIRA, R. L. C.; SANTOS, M. V. F.; LIRA, M. A.; SILVA, M. J.; SILVA, E. M. B. Composição química de

forrageiras e seletividade de bovinos em bosque de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) nos períodos chuvoso e seco. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 34, 1505-1511, 2005.